

**Untersuchungen an temperatur-
sensitiven atmungsdefizienten
Mutanten der Hefe
*Saccharomyces cerevisiae***

Den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Klaus Jäger
aus Ansbach

1985

Untersuchungen an temperatursensitiven
atmungsdefizienten Mutanten der Hefe
Saccharomyces cerevisiae

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Klaus Jäger

aus Ansbach

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung 16. DEZ. 1985

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. K. Brodersen

Erstberichterstatter: Professor Dr. E. Schweizer

Zweitberichterstatter: Professor Dr. W. Lotz

Meiner Frau Ursula
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1981 bis September 1985 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. E. Schweizer am Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Herrn Professor Dr. E. Schweizer danke ich herzlich für das Interesse, das er mir und meiner Arbeit jederzeit zuteil werden ließ.

Ferner möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biochemie für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	9
Benutzte Abkürzungen	13
I Einleitung	17
II Material und Methoden	
1. Geräte	20
2. Chemikalien	21
3. Enzyme	22
4. Hefestämme	22
5. Bakterienstämme	22
6. Medien	23
a) Hefemedien	
b) <u>E. coli</u> -Medien	
7. Puffersysteme	25
8. Plasmide	26
9. Nukleinsäurebestimmungen	26
10. Proteinbestimmungen	26
11. Isolierung von Mitochondrien	27
12. Herstellung reproduzierbarer Präparationen von submitochondriellen Partikeln	27
13. Enzymtests	28
14. Bestimmung der Atmungsrate mit der Sauerstoff- elektrode	31
15. Anzucht von pet-ts Mutanten unter nicht permissiven Bedingungen	31
16. Revertanten und rho-Tests	32
17. Isolierung der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Bäckerhefe	33
18. SDS - Polyacrylamidgel-Elektrophorese	34

19.	Immunologische Methoden	35
	a) Immunisierung gegen SDS-denaturierten ATPase Gesamtkomplex	
	b) Gewinnung von Antiseren	
	c) Immundoppeldiffusionstest nach Ouchterlony	
20.	Jodierung von Protein A	36
21.	"Western-Blot" Hybridisierung	38
22.	Darstellung der Zellrohextrakte von pet-ts Mutanten für die "Western-Blot"-Analysen	40
23.	Isolierung von ura 3/pet-ts Doppelmutanten	40
24.	<u>E. coli</u> Transformation	41
25.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	42
	a) "Miniscreen"- Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	
	b) Isolierung von Plasmid-DNA aus 1 l-Kulturen von <u>E. coli</u>	
26.	Transformation von <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	43
27.	Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe	45
28.	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA	45
29.	Agarosegel-Elektrophorese von DNA-Proben	46

III Ergebnisse

A. Aktivitätsbestimmung der Atmungskettenenzyme in pet-ts Mutanten verschiedener Komplementationsgruppen

1. Zeitliche Veränderung der Atmungskettenenzym-Aktivitäten bei der Anzucht von Wildtyp-Hefe auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

48

2. Inaktivierungskinetiken der Atmungsketten-Enzyme bei verschiedenen pet-ts Mutanten.	51
3. Routinemäßiges Durchtesten von pet-ts Mutanten aus 180 verschiedenen Komplementationsgruppen.	61
4. Suche nach spezifischen ATPase-Defekten bei pet-ts Mutanten.	81
 B. Immunologische Untersuchung an pet-ts Mutanten mit ATPase-Antiserum	
1. Reinigung der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Bäckerhefe.	94
2. Herstellung und Überprüfung eines spezifischen Antiserums gegen den gereinigten ATPase Gesamtkomplex der Hefe.	95
3. Optimierung der "Western-Blot"-Technik zur systematischen Untersuchung einer größeren Zahl verschiedener pet-ts Mutanten.	99
4. Radioimmunologische Untersuchungen von 149 pet-ts Mutanten aus 134 verschiedenen Komplementationsgruppen.	103
5. Vergleich der aus bc ₁ -Komplex-, Cytochromoxidase- und ATPase-Seren gewonnenen "Western-Blot" Analysen.	128

C.	Vorversuche zur Transformierbarkeit von pet-ts Mutanten mit Hilfe einer Hefegenbank	
1.	Beschreibung der verwendeten Genbank	142
2.	Darstellung von ura 3/pet-ts Doppelmutanten für die Hefetransformation.	144
3.	Transformation von pet-ts Mutanten	147
IV	Diskussion	150
V	Zusammenfassung	158
VI	Literaturverzeichnis	172

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Funktionelle Organisation der Elektronentransportkette in der inneren Mitochondrienmembran.	17
Abb. 2	Reinigung von ^{125}J -markiertem Protein A durch eine Sephadex G 25-Säule.	37
Abb. 3	Schematische Darstellung der Anordnung zum Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose.	39
Abb. 4	Zeitliche Veränderung von Atmungsrate und Zelldichte bei Anzucht von Wildtyp-Hefe in Laktat-Medium bei 22°C .	49
Abb. 5	Zeitliche Veränderung der Aktivitäten von Teilenzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in Wildtyp-Hefe bei Anzucht in 22°C Laktat-Medium.	50
Abb. 6	Wachstumskinetik von Wildtyp-Hefe bei Kultivation auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.	52
Abb. 7	Zeitliche Veränderung der Aktivitäten von Teilenzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in Wildtyp-Hefe bei Kultivation auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.	53
Abb. 8	Inaktivierungskinetiken der Atmungskettenenzyme von verschiedenen pet-ts Mutanten bei Kultivation unter nicht permissiven Bedingungen.	58
Abb. 9	Zusammenhänge bei Mehrfachdefekten in pet-ts Mutanten.	82
Abb. 10	Schematische, im Vergleich zum Wildtyp (=100%) normierte Darstellung der Atmungsketten-Enzymaktivitäten aller pet-ts Mutanten mit $< 20\%$ Wildtyp ATPase-Aktivität.	84

Abb.11	Aktivitätsprofil der Oligomycin-sensitiven ATPase im Saccharosegradienten.	97
Abb.12	SDS-Gelelektrophorese der isolierten Gesamt-ATPase.	98
Abb.13	Bestimmung des Molekulargewichtes der ATPase-Untereinheiten mit Hilfe des bc_1 -Komplexes als Eichprotein.	100
Abb.14	Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung der ATPase-Untereinheiten.	101
Abb.15	Kreuzreaktionen von Cytochromoxidase und bc_1 -Antisera mit gereinigter ATPase.	102
Abb.16	"Western-Blot"-Analysen einiger Wildtyp-Zellrohextrakte zusammengestellt aus verschiedenen Originalgelbildern.	105
Abb.17	"Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten ausgesuchter pet-ts Mutanten mit Wildtyp-artiger ATPase-Proteinstruktur.	106
Abb.18	"Western-Blot"-Analyse von Zellextrakten ausgesuchter pet-ts Mutanten, die sich bzgl. Untereinheit III der ATPase vom Wildtyp-Enzymmuster unterscheiden.	108
Abb.19	"Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten ausgesuchter pet-ts Mutanten, die sich bzgl. Untereinheit IV der ATPase vom Wildtyp-Enzymmuster unterscheiden.	110
Abb.20	"Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten ausgesuchter pet-ts Mutanten, die sich bzgl. der Untereinheit VIII der ATPase vom Enzymmuster des Wildtypstammes unterscheiden.	111

Abb.21	"Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten ausgesuchter pet-ts Mutanten, die sich bzgl. des ATPase-Bandenmusters stark vom Wildtyp-Bandenmuster unterscheiden (A,B), bzw. Intensitätsverstärkung der 19,9 kDa-Bande zeigen (C).	113
Abb.22	"Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten ausgesuchter pet-ts Mutanten der ATPase-negativen Komplementationsgruppen 104 und 209b.	114
Abb.23	"Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten ausgesuchter pet-ts Mutanten mit nahezu vollständigem Ausfall des ATPase-Komplexes.	116
Abb.24	Vergleich der "Western-Blot"-Analysen verschiedener pet-ts Mutanten aus gleichen Komplementationsgruppen.	122
Abb.25	Zusammenstellung und schematische Darstellung der "Western-Blot"-Bandenmuster aller in dieser Arbeit untersuchten pet-ts Mutanten.	124
Abb.26	Restriktionskarte des Plasmids pFL 1.	143
Abb.27	Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA von 24 willkürlich ausgewählten Klonen der Lacroux-Genbank.	145
Abb.28	In dieser Abbildung sind 22 Original-Gelbilder der in dieser Arbeit durchgeführten "Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten aus pet-ts Mutanten gezeigt.	160
Tab. 1	Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.	63
Tab. 8	ATPase-Aktivitäten in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.	88

Tab.10	Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten der Komplementationsgruppen 104 und 209b.	92
Tab.11	Anreicherungsschema der ATPase-Isolierung.	96
Tab.12	Abbau der ATPase-Untereinheiten verglichen mit der Gesamt ATPase-Aktivität.	118
Tab.13	Vergleich der Untereinheiten-Muster von ATPase, bc_1 -Komplex und Cytochromoxidase in verschiedenen pet-ts Mutanten.	130
Tab.14	Transformation von ura3/pet-ts Mutanten mit einer <u>S. cerevisiae</u> Genbank im Vektor pFL 1.	

Benutzte Abkürzungen

a/ α	Paarungstypen der Hefe <u>S. cerevisiae</u>
A	Absorption
a, a ₃	Cytochrome a
ac	Acetat
ade	Gensymbol für Adenin-Biosyntheselocus
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ap	Ampicillin
Ap ^r	Ampicillin resistent (Resistenz)
b	Cytochrom b
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin
c, c ₁	Cytochrome c
CBB	Coomassie Brilliant Blue
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
Cm ^r	Chloramphenicol resistent (Resistenz)
Cm ^s	Chloramphenicol sensitiv (Sensitivität)
Cpm	Zählereignisse pro Minute
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
deion.	deionisiert
DCIP	Dichlorphenolindophenol
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonuleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
cytDNA	Kern-DNA
mtDNA	mitochondrielle DNA
DTT	Dithiothreitol

EACA	ε -Amino-n-capronsäure
EC	Enzyme Comission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
ε	molarer Extinktionskoeffizient
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FeS	Eisen-Schwefel-Protein
FMN	Flavinmononucleotid
g	Gramm
x g	-fache Erdbeschleunigung
mtGenom	mitochondrielles Genom
h	Stunden
Hz	Hertz, Schwingungen pro Sekunde
IpM	Impulse pro Minute
¹²⁵ J	Isotop von Jod mit dem Atomgewicht 125
kB	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Daltons
KE	Klett-Einheiten
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria Broth
M	Molar
mA	Milliamper
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
MRA	Minimal Regeneration Agar

NADH/NAD ⁺	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid reduziert/oxidiert
Na-PO ₄	Natriumphosphat-Puffer
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAB	p-amino-Benzamidin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PEG	Polyethylenglycol
pet	petite-Mutation
PMSF	Phenylmenthansulfonylfluorid
pro	Gensymbol für Prolin-Biosyntheselocus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
mRNA	Messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg Einheiten
S.	Saccharomyces
SCE	Sorbit/Citrat/EDTA-Puffer
SDS	Natriumlaurylsulfat
SED	Sorbit/EDTA-Puffer
SKE	Sucrose/Kalium-Phosphat/EDTA-Puffer
SMP	Submitochondrielle Partikel
SOS	"Save our Spheroplasts"-Puffer
SSPE	Standard Saline Phosphate EDTA-Puffer

TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tricin	Tris (hydroximethyl)methylglycin
Tris	Trishydroximethylaminomethan
ts	temperatur-sensitive Mutation
U	Enzymeinheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
YEP	Yeast Extrakt Peptone Medium

I. EINLEITUNG

Mitochondrien sind Zellorganellen, die in allen eukaryontischen, aerob lebenden Organismen vorkommen. Sie enthalten eine eigene DNA sowie einen eigenen Transcriptions- und Translationsapparat (32). In der inneren Mitochondrienmembran befinden sich die Multienzymsysteme der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung, während in der Matrix u. a. die Enzyme der Tricarbonsäurezyklus und oft auch die der Fettsäure β -Oxidation enthalten sind. Mitochondrien sind Orte der Zellatmung, d.h. der Oxidation endogener Nährstoffe durch molekularen Sauerstoff. Die dabei freiwerdende Energie wird zum Teil als chemische Energie in Form der energiereichen Verbindung Adenosin 5-triphosphat konserviert. Diese Verbindung stellt die gängigste "Energiewährung" der Zelle dar. In der Atmungskette werden Elektronen in einer Folge hintereinander geschalteter Redoxreaktionen von NADH bzw. Succinat auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die Atmungskette besteht aus einem System Membran-gebundener, in bisher noch nicht bekannter Weise räumlich zueinander organisierter Enzymkomplexe. Im einzelnen sind dies die Enzyme NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), Succinat: Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II), Ubichinon: Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III) und Cytochromoxidase (Komplex IV). Die Organisation der Atmungskette ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

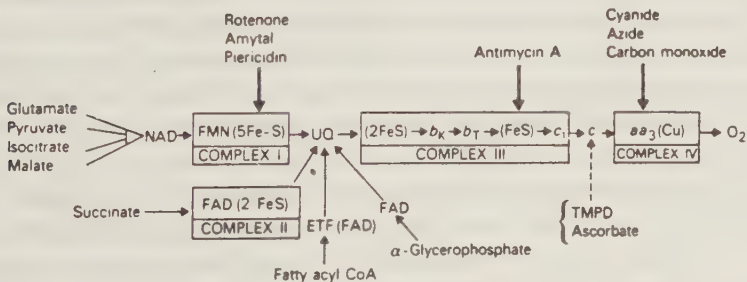


Abb. 1 Funktionelle Organisation der Elektronentransportkette in der inneren Mitochondrienmembran (33)

In dieser Abbildung ist ETF das elektronenübertragende Flavoprotein und FeS das Eisen-Schwefel-Protein.

Neben Ihrer Funktion als Redox-Komponenten in der Elektronen-Transportkette wirken zumindest einige, möglicherweise aber alle 4 Komplexe auch als Protonenpumpen. Dabei werden Protonen durch die Mitochondrienmembran nach außen gepumpt, was zu einem pH-Gradienten zwischen Innen- und Außenseite ebenso wie zur Ausbildung eines Membranpotentials an der Mitochondrienmembran führt. Das elektrochemische Potential der so "energetisierten Membran" stammt aus dem Elektronentransport. Beim Ausgleich des pH-Gradienten bzw. des Membranpotentials kommt es nach einer inzwischen allgemein akzeptierten Hypothese (37) zur Synthese von intramitochondrialem ATP. Die ATP-Synthese wird durch die ATPase bzw. ATP- Synthase katalysiert.

Alle genannten Enzyme bzw. Enzymkomplexe der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung sind aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt. Ein Teil der Untereinheiten wird von mitochondrialer DNA kodiert, während der zahlenmäßig bei weitem größere Rest kernkodiert ist (36). In Hefe konnten die wichtigsten mitochondrial synthetisierten Proteine identifiziert werden. (35,49, 50) Es sind dies Apocytochrom b, die Untereinheiten I, II, III der Cytochromoxidase, 3 ATPase-Untereinheiten (VI, IX und VIII) und ein ribosomales Protein, das sog. var 1-Protein. Die Synthese der Atmungskettenenzyme benötigt somit das Zusammenwirken zweier genetischer Systeme, der DNA des Zellkerns und der DNA der Mitochondrien. Während die mitochondrial kodierten Komponenten bereits eingehend untersucht wurden (38,39,40,41,42,49,50) ist über die Regulation und Biosynthese der kernkodierten Untereinheiten dieser Enzymsysteme noch wenig bekannt. Diesbezügliche Untersuchungen an Atmungs-defizienten pet-ts Mutanten von Saccharomyces cerevisiae wurden daher in unserem Institut in der Hoffnung aufgenommen, dadurch Einblick in diese Problematik zu erhalten.

In den vergangenen Jahren wurden in diesem Institut ca. 4000 kernkodierte, temperatursensitive, atmungsdefekte Mutanten isoliert. Durch genetische Komplementationsanalyse wurden diese Mutanten insgesamt ca. 290 verschiedenen Komplementationsgruppen (Genen) zugeordnet (43). Die Mutanten zeichnen sich dadurch aus, daß sie bei niedriger, sogenannter permissiver Temperatur (22 °C) in ihrem Verhalten dem Wildtyp gleichen, d.h. auf Glukose ebenso

wie auf Laktat als Kohlenstoffquelle wachsen, bei erhöhter, nicht permissiver Temperatur (36 °C) jedoch auf einer obligat aeroben Kohlenstoffquelle wie Laktat nicht mehr wachstumsfähig sind.

Aufgabe des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, zunächst bei einer größeren Anzahl dieser Mutanten mit biochemischen Methoden enzymatische Defekte in der Atmungskette der jeweiligen Mutante zu bestimmen. Es sollte dadurch möglich sein, sowohl spezifische Defekte wie auch kombinierte Ausfälle mehrerer Enzymaktivitäten als Folge eines bestimmten Mutationsdefektes zu ermitteln. Besonderes Augenmerk sollte dabei speziell auf die Charakterisierung ATPase-negativer Mutanten gerichtet werden. Die kernkodierte Untereinheiten der ATPase werden zumeist als Vorstufen im Cytoplasma synthetisiert, diese werden ins Mitochondrium importiert, dabei prozessiert und an entsprechender Stelle in die Membran eingebaut (34,44, 45,46). Es müssen also neben Strukturgenen für die einzelnen Untereinheiten auch noch eine Reihe zusätzlicher Gene vorhanden sein, welche für Funktionen kodieren, die an der Biosynthese eines intakten, in die Mitochondrienmembran eingebauten und funktionsfähigen ATPase-Komplex beteiligt sind.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen dann bei einer größeren Anzahl Atmungs-defizienter, nuklearer Hefemutanten mit immunologischen Methoden die ATPase-Untereinheitenmuster im Zellrohextrakt untersucht werden. Dabei sollte deutlich werden, in welchen Mutanten die Atmungsdefizienz Folge eines spezifischen und wo sie die eines weitgehenden pleiotropen ATPase-Proteinstrukturdefektes ist. Aus den dabei erhaltenen Ergebnissen sollten nach Möglichkeit Gen/Genprodukt/Funktions-Beziehungen oder Vorprodukt/Produkt/Abbauprodukt-Beziehungen für das genannte System abgeleitet werden. Schließlich sollten in dieser Arbeit auch noch mit ATPase-negativen Mutanten Vorversuche zur Isolierung der in diesen Mutanten betroffenen Gene durchgeführt werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Geräte

Autoklav (Typ A 5 Wbeco, Bad Schwartau), Schüttler (New Brunswick Modell G 25, USA), Rolltrommel (Modell TC 5 New Brunswick, USA), Kolorimeter zur Zelldichtebestimmung (Klett-Summerson Typ 800-3 mit Blaufilter Nr. 42 und Grünfilter Nr. MFG Co. Inc., New York), Spektralphotometer (Gilford Modell 250 mit Schreiber Modell 1100 und Aminco DW-2 UV/VIS), Zellhomogenisator (Typ MSK, Braun, Melsungen und Manton-Gaulin, Manton-Gaulin MFG Co. Inc., Everett, Mass. USA), Durahm-Röhrchen (40 x 8 mm, Waldeck, Münster), Ultraschallgerät (Sonifier B 12, Branson), Oscillograph (OSC-3C, Yizreel Electronics), Ultraschallmesszelle (UT-5 nach Prof. Gersonde Aachen), Sauerstoffelektrode (Rank Brothers, Cambridge U.K.), Kompensationsschreiber (Servogor RE 211), Thermostaten und Wasserbäder (Exatherm U 3 elektronik, Julabo; Thermomix GFL, Braun, Melsungen), Glasperlen (Wild, Bayreuth), Kühlzentrifugen (Sorvall Superspeed RC-5 und Beckmann J 21 B), Ultrazentrifuge (Beckmann L5-65), Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5412), Waagen (Mettler P 1000 N, P 1200), Mikrowaage (Sartorius 2415), Mikroskop (Zeiss standart 14), pH-Meter (Knick 511), Automatikpipetten (Gilson Pipetman und Finnpipette), Netzgerät (Desaga Modell 500/500), Brutschrank (Heraeus VI 5050 EK), Folienerschweißgerät (FG 2, Bosch), UV-Lampe (Desaga, Mini UVIS), Szintillationsmesser (Typ 5-40, Mini Instruments LTD., Essex U.K. und Tricarb Modell 3320, Packard Instruments Co. Inc., Frankfurt), Vakuumzentrifuge (Speed Vak, Bachofer, Reutlingen), Röntgenfilme (Fuji RX 100), Röntgenfilm Kodak, Verstärkerfolien (DU Pont Cronex), Kamera (Polaroid MP 4, Film (Polaroid 665), Dismembrator (B. Braun), Vakuumtrockenschrank (Heräus), Magnetprüher (IKA Combimag), Eismaschine (Scotsman), Plastikfolien aus Polycarbonat (Melitta), Ultrafiltrationszelle (Aminco, Modell 202, Aminco Corp., Lexington, Mass. USA), Gefrierschränke - 20 °C (Privileg, Bosch), Tiefkühlschrank - 70 °C (Ceco 1130).

2. Chemikalien

Die folgenden Substanzen wurden gekauft:

K-Acetat, Mg-Acetat, NA-Acetat, Ammoniumolybdat, Ammoniumperoxodisulfat, Barbital, Bernsteinsäure, Borsäure, Kalziumchlorid, CsCl, DMSO, EDTA, EtBr, Folien-Reagenz, Glycerin, i-Propanol, KCN, di-Kaliumhydrogenphosphat, Kalium-dihydrogenphosphat, Mercaptoethanol Magnesiumsulfat, NaCl, NaOH, di Natrium-hydrogenphosphat, Natrium-dihydrogenphosphat Phenol, PMSF, Photorex, RbCl, Sorbit (Merck, Darmstadt), Agarose (low EEO), Na-2-aminosalicylat, BSA (Fr. V), m-Cresol, DAPI, DL-Galaktose, 8-Hydroxichinolin, Sepharose 2 B, Sephadex G 25 (Pharmazia), Acrylamid, Ammoniumsulfat, Ampicillin, Bis-acrylamid, Bisbenzimid, Bromphenolblau, Chloramin T, Coomassie Brilliant Blue G 250, CM Affi Blue (Biorad), Cytochrom c aus Pferdeherz, D-Glycerat-3-Phosphat, Dowex 1-chlorid X-8, EACA, Fluram, Harnstoff, Kakodylsäure, Mannit, Oligomycin, PAB, Acrylamid, Sarosyl, SDS, Temed, Tetracyclin, Tricin, Triton X-100, Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-trypton, Freund'sches Adjuvans, Hefeextrakt (Difco, Detroit USA), Yeast Nitrogen Base (Difco), Adenin, ATP, Guanosin, NADH (Böhringer, Mannheim), Milchsäure, Tri-Na-citrat (Roth, Karlsruhe), Polyäthylenglycol, Saccarose (Bäko, Erlangen), Ethanol unvergällt (Roth), Antibiotic Medium Nr. 3, Nutrient Broth (Oxoid, Wesel), Ficoll 400, Polyvinylpyrrolidon (Pharmacia, Freiburg), Na¹²⁵J 100 mCi/ml (Amersham Buchler, Braunschweig), Filterpapier Whatman 3 mm (Whatmann, Maidstone U.K.) Nitrocellulosefilter BA 85 (Schleicher & Schüll, Dassel), Quickzint 212 (Zinsser, Frankfurt), Arginin, Histidin, Isoleucin, Lysinmonohydrochlorid, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Chloroform, Trizma Base, Isoamylalkohol, MOPS (Sigma GmbH, Taufkirchen), CBB G 250, Cholsäure Na-Salz, Glycin.

3. Enzyme

Glusulase (Sigma), Zymolyase 60.000 (Miles GmbH, Frankfurt), DNA Polymerase I, Ribonuklease T 1, Proteinase K, Restriktionsendonuklease Sal I, Hind III (Böhringer, Mannheim), Ribonuklease A, (50.000 - 70.000 U/mg, bovine pancreas Type II-A, Sigma, München) DNase I (450 U/mg, bovine pancreas, Serva, Heidelberg)

4. Hefestämme

Als Wildtyp-Hefe wurde der genetisch definierte Stamm SC 167 (a, ade 1; erhalten von Dr. M. Esposito, Chicago) verwendet. Die in dieser Arbeit untersuchten pet-ts Mutanten standen am hiesigen Institut zur Verfügung und leiteten sich von dem Stamm SC 167 ab (1). Die zur ATPase Isolation verwendete Bäckerhefe wurde bei der Firma Bast Nürnberg, gekauft.

5. Bakterienstämme

Folgender E. coli K 12 Stamm wurde bei Klonierungsexperimenten mit dem Plasmid pFL1 benutzt:

RR 1 (pro, leu, thi, lac Y, hsd R, end A, rps L20, gal K2, xgl-5, mtl-1, sup E 44). (2).

6. Medien

a.) Hefe-Medien:

Galactose-Medium:

1% Galactose, 1 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 0,01 % Adenin,
0,005 % Guanosin.

Lactat-Medium:

3 % K-Lactat, pH 5,5, 0,6 % Pepton, 0,3 % Hefeextrakt,
0,01 % Adenin, 0,005 % Guanosin.

Lactat-Medium ohne Uracil:

3 % K-Lactat, pH 5,5, 0,67 % Yeast Nitrogen Base,
100 ml/l Aminosäure-Mix ohne Uracil.

Synthetisches Komplettmedium ohne Uracil:

0,67 % Yeast Nitrogen Base, 2 % Zucker, 100 ml/l Amino-
säuremix ohne Uracil.

Aminosäure-Mix ohne Uracil:

0,2 % Arginin, 0,1 % Histidin, 0,6 % Isoleucin,
0,6 % Leucin, 0,4 % Lysinmonohydrochlorid, 0,1 % Methionin,
0,6 % Phenylalanin, 0,5 % Theronin, 0,1 % Adenin,
0,4 % Tryptophan.

Sporulations-Medium:

0,25 % Hefeextrakt, 1 % K-Acetat, 0,5 % diKaliumhydrogen-
phosphat, 0,5 % Kaliumdihydrogenphosphat.

Vorsporulations-Medium:

0,5 % diKaliumhydrogenphosphat, 0,5 % Kaliumdihydrogen-
phosphat, 0,5 % Hefeextrakt, 0,75 % Pepton, 20 ml/l Glycerin.

YEP-Medium:

0,5 % di-Kaliumhydrogenphosphat, 0,5 % Kalium-dihydrogenphosphat, 2 % Zucker, 0,75 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt.

Für Festmedien wurden jeweils 2 % Agar hinzugegeben.

MRA-Agar:

1 M Sorbit, 0,67 % Yeast Nitrogen Base, 2 % Glucose, 2 % Agar, 100 ml/l Aminosäure-Mix ohne Uracil.

Selektions-Agar:

1 M Sorbit, 0,67 % Yeast Nitrogen Base, 2 % Glucose, 2 % Bacto-Agar, 100 ml/l Aminosäure-Mix ohne Uracil.

Regenerations-Agar:

Der Regenerations-Agar besaß dieselbe Zusammensetzung wie der Selektions-Agar, nur enthielt er zusätzlich 0,004 % Uracil.

b.) E. coli- Medien:

LB-Medium:

1 % NaCl, 1 % Bacto-Tryptone, 0,5 % Hefeextrakt pH 7,6 mit NaOH.

Für selektive Zwecke wurden dem Medium 20 mg/l Ampicilin (in Wasser) oder 20 mg/l Tetracyclin (in Ethanol) nach dem Autoklavieren zugesetzt. Bei Festmedien wurden 2 % Agar zugegeben.

Z-Broth:

1,6 % Nutrient-Broth, 1 % Pepton, 0,2 % Glucose pH 7,5 mit NaOH.

Die Sterilisation aller Medien erfolgte im Autoklaven auf 130 °C für 40 Minuten.

7. Puffersysteme

SSC-Puffer:

0,15 M NaCl, 0,015 M Nacitrat pH 7,0

10 x TBE:

0,89 M Tris, 25 mM EDTA, pH 7,8 mit Borsäure

Transferpuffer:

192 mM Glycerin, 25 mM Tris, 20 % Methanol, pH 8,3

Barbituratpuffer:

70 mM Na - 5,5 - diethylbarbiturat, pH 8,6 mit HCl

PBS-Puffer:

10 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 150 mM NaCl

SED-Puffer:

25 mM EDTA, 1 M Sorbit, pH 8,0

SCE-Puffer:

1 M Sorbit, 0,01 M EDTA, 0,1 M Nacitrat, pH 5,8

Calciumchlorid-Sorbit-Puffer:

10 mM Tris, 10 mM Calciumchlorid, 1 M Sorbit, pH 7,4

PEG:

10 mM Calciumchlorid, 20 % Polyethylenglycol 4000, 10 mM Tris,
pH 7,4

SOS-Puffer:

6,7 ml YEP, 5m 5 Calciumchlorid, 0,002 % Uracil, 1 M Sorbit
ad 10 ml deion. Wasser.

TE-Puffer:

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

Transferpuffer für "Westernblot":

192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % Methanol

8. Plasmide

Von Dr. F. Lacroute, Straßburg, wurde eine Hefe-DNA Genbank, kloniert im Vektor pFL 1 (3) erhalten.

9. Nukleinsäurebestimmung

Nukleinsäurekonzentrationen wurden durch Absorptionsmessungen bei 260 nm bestimmt. Als Umrechnungsfaktor wurde bei RNA 1 A_{260} für eine Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ und bei DNA 1 A_{260} für eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ angenommen.

10. Proteinbestimmungen

Protein wurde nach der Methode von Lowry (4) bestimmt. In Gegenwart von Cholsäure, Desoxycholsäure oder Triton X-100 wurde die Proteinbestimmung nach Bradford (5) durchgeführt. Dazu diente das käufliche Bio-Rad-Protein-Testgemisch der Firma Bio-Rad. In Gegenwart von SDS kann dieser Proteintest allerdings nicht verwendet werden. Der Proteingehalt von für den "Western-Blot" aufgeschlossenen SDS-haltigen Zellysaten wurde daher nach der Methode von

Whitaker und Granum (6) gemessen. In diesem Fall mißt man die Absorption der Proteinlösung bei 235 nm und errechnet aus diesen Meßwerten die Proteinkonzentration. Diese Methode wurde zur Kontrolle mit der Mikrobiuret-methode (7) verglichen (8).

11. Isolierung von Mitochondrien

Die vom Kulturmedium abzentrifugierten Hefezellen wurden zunächst mit Tris-Puffer (0,25 M Sorbit, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-acetat pH 7,5) 1 Mal gewaschen und, sofern sie nicht zwischenzeitlich bei -20 °C eingefroren aufbewahrt wurden, folgendermaßen aufgeschlossen: ca 3×10^9 Hefezellen wurden in 0,5 ml Tris-Puffer pH 7,5 (s.o.) suspendiert und in ein auf -20 °C vorgekühltes Durham-Röhrchen gegeben, das zu ca. 2/3 seines Volumens mit -20°C vorgekühlten Glasperlen gefüllt war (1/4 Vol. kleiner (0,18 mm) und 3/4 Vol. größerer (0,5 mm Glasperlen). Nach Zugabe von 10 µl PMSF-Lösung (250 mg PMSF/ml Aceton) wurden die Zellen durch dreiminütiges Schütteln mit Glasperlen (Braun Melsungen Nr. 54160) im Braun-Homogenisator aufgeschlossen. Mit dieser Methode konnten 80 - 90 % der Zellen aufgeschlossen werden. Nach Abzentrifugation (10 min., 1100 xg) ganzer Zellen und großer Zelltrümmer wurden aus dem erhaltenen trüben Überstand die Mitochondrien bzw. submitochondriellen Partikel (SMP) durch 45-minütiges Zentrifugieren bei 7200 xg isoliert. Der erhaltene Niederschlag wurde 1 Mal mit Tris-Puffer pH 7,5 gewaschen und konnte bei -20 °C 1-2 Wochen für die enzymatischen Untersuchungen aufbewahrt werden.

12. Herstellung reproduzierbarer Präparationen von submitochondriellen Partikeln

Mitochondrien wurden in ca. 2 ml Tris-Puffer pH 7,5 (0,25 M Sorbit 10 mM EDTA/ 50 mM Tris-Acetate pH 7,5) aufgenommen und 40 min. in einer am hiesigen Institut entwickelten Anordnung beschallt. Die Anordnung bestand aus einem Ultraschallgerät und einem speziell_

konstruiertem Probegefäß, das mit einem Piezoelement zur Schallwellenkontrolle in der Lösung ausgestattet war (9). Dieser Meßfühler war mit einem Oszillographen verbunden, welcher die Schallwellen in der Probe sichtbar und damit über Frequenz- und Intensitätsregelung kontrollierbar machte. Es gelang mit der geschilderten Anordnung Ultraschallwellen mit definierter Frequenz und konstanter Amplitude zu erzeugen. Als Folge einer solchen Behandlung war es dann möglich, homogene und in ihrer Aktivität zeitlich konstante Membranzym-Präparationen herzustellen. Die entsprechenden Versuche und Fehlerabschätzungen wurden in (9) durchgeführt.

13. Enzymtests

Sämtliche Enzymtests wurden in einer bei 23 °C thermostatisierten 1 cm Glasküvette gemessen.

a.) Cytochromoxidase:

In einem Testgemisch, welches in einem Gesamtvolumen von 0,7 ml 50 mM Tris-kakodylat pH 7,0, 2 mM EDTA und 40 µM reduziertes Cytochrom c enthält, wurde die Reaktion durch Zugabe von 20-50 µg SMP gestartet. Die Abnahme an reduziertem Cytochrom wurde anhand der Extinktionsänderung bei 550 nm kinetisch verfolgt.

b.) NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase:

In einem Testansatz, der in einem Gesamtvolumen von 0,7 ml 50 mM Tris-kakodylat pH 7,0, 2 mM EDTA, 0,2 mM KCN, 40 µM oxidiertes Cytochrom c und 5 - 20 µg SMP enthält, wurde nach Aufnahme des Blindlaufes bei 550 nm während 1-2 min. die Reduktion von Cytochrom c durch Zugabe von 56 µM NADH gestartet.

c.) Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase:

Ein Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 0,7 ml 50 mM Tris-kakodylat pH 8,0, 2 mM EDTA, 0,2 mM KCN, oxidiertes Cytochrom c (40 µM) und 5-20 µg SMP. Nach Beobachtung

des Blindlaufes bei 550 nm wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μ l mM Na-Succinat pH 8,0 gestartet.

d.) Succinat-Dehydrogenase:

In einem Testsystem (Gesamtvolumen 0,7 ml), das aus 50 mM an Tris-kakodylat pH 7,0, 2 mM an EDTA, 0,2 mM an KCN und 10 mM an Na-Succinat pH 8,0 bestand, wurden 10 μ l BSA und 5-20 μ g SMP zugegeben und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 0,65 mM PMS und 50 μ M DCIP gestartet wurde. Gemessen wurde die zeitliche Abnahme der Extinktion bei 600 nm.

e.) NADH: Ubichinon Oxidoreduktase:

Die Reaktion wurde in einem Testsystem (Gesamtvolumen 0,7 ml) das 50 mM Tris-kakodylat pH 7,0, 2 mM EDTA, 0,2 mM KCN, 100 μ M Ubichinon-1, 100 μ M DCIP und 5-20 μ g SMP enthielt, durch Zugabe von 60 μ M NADH gestartet.

Die oben beschriebenen Enzymteste wurden am Aminco Spektralphotometer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der Formel:

$$\Delta c = \frac{\Delta OD/min}{d \cdot \epsilon}$$

Der Faktor $\Delta OD/min$ kann auf Grund der eingestellten Variablen am Photometer so formuliert werden:

$$\Delta OD/min = \frac{Y \cdot f/10}{X \cdot F/60}$$

wobei X und Y die Koordinaten auf der Abszisse bzw. Ordinate (in Inch) eines auf dem linearen Anstieg der Meßkurve liegenden Punktes sind. f ist die am Spektralphotometer eingestellte Empfindlichkeit in OD/10 Inch, F ist die Geschwindigkeit des Meßschreibers in sec/Inch. Setzt man die Steigung

$$Y/X = \tan a \quad \text{so gilt:}$$

$$\Delta OD/min = 6 \cdot \tan a \cdot f/F$$

Der Winkel a ist dann in diesem Fall der Winkel zwischen der aufgenommenen Meßkurve ohne Enzymzugabe (Nullkurve) und dem linearen Anstieg der Meßkurve mit zugegebenen Enzym. Eingesetzt in die obige Formel bei einem Küvettenvolumen von 0,7 ml und einer Küvettenbreite von $d = 1$ cm ergibt sich folgende Auswertformel für die spezifische Aktivität:

$$Ac(spez) = 4,2 \cdot \frac{\tan a \cdot f \cdot 10^6}{V \cdot F \cdot C \cdot \epsilon}$$

Dabei ist C die Proteinkonzentration und V das zugegebene Probenvolumen in μl .

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ von reduziertem gegenüber oxidiertem Cytochrom c bei 550 nm ist $19,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (10).

Für die Reduktion von DCIP wurde der Extinktionskoeffizient ϵ (600 nm) = $21 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (11) benutzt.

f.) ATPase

In einem Reagenzglas wurde in einem Testvolumen von 0,5 ml ATP (8 mM) mit 5-20 μg SMP in Gegenwart von 50 mM Tris-Sulfat pH 8,5 und 2 mM Magnesiumsulfat für 10 min. bei 36 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,1 ml 50 %iger Trichlor-essigsäure gestoppt und das Reaktionsgemisch mit 3,8 ml deion. Wasser, 0,4 ml 5 % Ammoniummolybdat in 5 n Schwefelsäure und 0,2 ml 20 %iger Photorex-Lösung (1 Teil Photorex mit 3 Teilen Natriumdithionit verreiben und kurz vor jedem Versuch eine 20 %ige Lösung in bidestilliertem Wasser frisch hergestellt) versetzt. Genau 10 min. nach Zugabe der Photorex-Lösung bestimmte man die Absorption bei 580 nm photometrisch. Das in der Probe enthaltene anorganische Phosphat läßt sich nach der Formel

$$\mu \text{Mole}(\text{PO}_4^{3-}) = 2,027 \cdot E - 0,004$$

errechnen (9).

Zur Messung des Anteils Oligomycin-sensitiver ATPase an der Gesamt ATPase-Aktivität wurde derselbe Test jeweils auch in Gegenwart von 100 μ M Oligomycin (Zugabe von 20 μ l einer ethanolischen Lösung von 1.1 mg/ml) durchgeführt. Zum Vergleichsansatz ohne Hemmstoff gab man in diesen Versuchen jeweils eine entsprechende Menge Ethanol ohne Oligomycin zu.

14. Bestimmung der Atmungsrate mit der Sauerstoffelektrode.

Die endogenen Atmungsraten ganzer Hefezellen wurde polarographisch an einer Rank-Sauerstoffelektrode mit angeschlossenem Y-Kompensationsschreiber bestimmt. In 2 ml einer Suspension von Hefezellen mit optischer Dichte wurde bei 25 °C die zeitliche Abnahme an Sauerstoff gemessen.

15. Anzucht von pet-ts Mutanten unter nicht permissiven Bedingungen.

Um von jedem zu untersuchenden Mutantenstamm einen genetisch reinen Klon zu erhalten, wurden entsprechend ausplattierte Zellen auf YEP-Agar bei Raumtemperatur solange inkubiert, bis einzelne Klone zu sehen waren.

Zum Beimpfen des 100 ml Lactat Flüssigmediums wurden nur solche Klone verwendet, die nachweislich temperatursensitiv und atmungsdefekt (s. Revertantentest) waren.

Mit dieser Lactat-Vorkultur wurde nach 12 Stunden eine 1 l Galaktose-Flüssigkultur beimpft. Die Ernte der Zellen aus diesem Galaktosemedium begann nach 36 Stunden Wachstum bei 36 °C. Um die Teilungsrate der Zellen bei nicht permissiver Temperatur (36 °C) zu erfassen, wurde die Zellzahl jeweils vor dem Temperatur-Erhöhung ebenso wie nach 36 Stunden Wachstum im 36 °C Galaktosemedium gemessen.

16. Revertanten- und rho-Tests.

Grundsätzlich wurde jede Mutantenkultur vor dem Abernten auf ihren Revertantengehalt überprüft. Dazu wurden 30 Mikroliter der Zellsuspension in 5 ml steriles Wasser gegeben und nach entsprechender Verdünnung auf YEP-Agar ausgestrichen. Nach 2-3 tägiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die YEP-Platte jeweils auf eine 36 °C und eine 23 °C Lactat-Agarplatte überstempelt. Die Auswertung erfolgte nach 3 - 4 Tagen Inkubation bei den angegebenen Temperaturen durch Vergleich der beiden Abdrücke: Mutantenkolonien sollten nur auf 23 °C Platte, Revertanten sowohl bei 23 °C und 36 °C auf den Lactat-Agarplatten wachsen.

Außerdem lassen sich die temperatursensitiven nuklearen "petite" Mutanten von den spontan entstehenden und alle hier interessierenden Tests störenden mitochondriell kodierten "petite"-Mutanten (sog. rho-Typ) leicht dadurch unterscheiden, daß rho-Mutanten auch bei permissiver Temperatur nicht auf Lactat-Agar wachsen. Solche rho-Mutationen treten bei verschiedenen Stämmen mit wechselnder, gelegentlich beträchtlicher spontaner Häufigkeit auf. Deshalb wurde eine Differenzierung zwischen cytoplasmatischen rho-Mutanten und vegetativen, nuklear kodierten pet-Mutanten stets routinemäßig nach der Anzucht von Mutantenkulturen ebenfalls durchgeführt.

Bei der Verwendung von ura 3/pet-ts Doppelmutanten für Transformationsexperimente war eine hohe Reversionsstabilität der verwendeten pet-ts Mutationen nötig. In Vorversuchen wurden daher diese Doppelmutanten zunächst mit einem verschärften Revertantentest folgendermaßen getestet: Die ura 3/pet-ts Doppelmutante wurde 2-3 Tage bei Raumtemperatur in 5 ml YEP-Flüssigkeitsmedium angezogen, danach 0,3 ml der dickgewachsenen Hefekultur auf YEP-Festmedium ausgestrichen. War der Rasen gut hochgewachsen, überstempelte man die YEP-Platte auf eine 36 °C LAC-Agarplatte. Die Auswertung erfolgte nach 10-14 Tagen durch Vergleich der beiden Abdrücke: Auf den 23 °C Platten wuchsen die Zellen normal, auf den 36 °C LAC-Platten machten die Zellen noch 1-2 Teilungen durch und

stellten das Wachstum dann ein. Die 36 °C LAC-Platte zeigte daher nur einen leicht angewachsenen Hintergrund, auf dem man Revertanten leicht erkennen konnte.

Generell wurde für Transformationsversuche *ura 3/pet-ts* Doppelmutanten verwendet, die auf einer 36 °C Lactatplatte keinen einzigen Revertantenklon zeigten. Die Mutanten wurden jeweils direkt vor der Transformation nach dem obigen Verfahren getestet. Weiterhin wurden die Zellen auch noch nach der Anzucht, d.h. kurz vor der Protoplastierung und Transformation routinemäßig auf Revertanten getestet.

17. Isolierung der oligomycinsensitiven ATPase aus Bäckerhefe

Mitochondrien zur ATPase-Isolierung wurde prinzipiell nach der Methode von Lang et al (13), d.h. durch manuelles Schütteln intakter Hefezellen mit Glasperlen und anschließender Zellfraktionierung durch Zentrifugation gewonnen. Im einzelnen wurde dabei wie folgt vorgegangen: 150 g käufliche Bäckerhefe wurde in 150 ml 250 mM Mannit/ 10 mM Tris-Acetat pH 7,5/ 2 mM EDTA suspendiert und mit demselben Puffer durch Zentrifugieren (3000 xg, 1 min 40°C) und Resuspendieren 2 Mal gewaschen. Die gewaschene Hefe wurde in 300 ml 500 mM Mannit/ 50 mM Tris-Acetat pH 7,5/ 2 mM EDTA/ 2mM ATP/ 2mM PMSF/ 10 mM EACA/ 0,2 % BSA suspendiert und auf 6 dicht verschließbare 250 ml Becher gleichmäßig verteilt. Dazu gab man soviele kalte sterile Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm), daß die Glasperlen bis auf 1 cm an die Flüssigkeitsobergrenze heranreichte. Durch heftiges Schütteln von Hand (Amplitude 50 cm, 2Hz) wurden die Zellen nach 4 min. pro Becher bis zu 80 % aufgeschlossen. Die Glasperlen wurden mit 1 l 10 mM Tris-Acetat pH 7,5/250 mM Mannit/ 2 mM EDTA/ 2 mM ATP/ 0,5 mM PMSF/ 5 mM EACA gewaschen und alle Überstände gesammelt. Zelltrümmer und Zellkerne entfernte man durch Zentrifugation (1100 xg, 3 min, 4 °C). Aus dem Überstand zentrifugierte man die intakten Mitochondrien bei 17000 xg, 8 min. 4 °C. Die abzentrifugierten Mitochondrien wurden im gleichen Puffer bei gleichen Zentrifugationsbedingungen 2 Mal gewaschen. Die gewaschenen Mitochondrien wurden zur Lyse in einem Becherglas 250 mM Saccharose/ 50 mM Tricin-OH pH 8,0/ 2 mM EDTA/ 5 mM EACA/ 2 mM ATP in einer Konzentration von 7 mg/ml aufgenommen.

Es gab anschließend zwei Möglichkeiten, die Mitochondrien zu lysieren:

- (a) Resuspension und Zugabe von CHAPS zur Endkonzentration 10 mM (14) oder
- (b) resuspendierte Mitochondrien zu 0,1 % Triton und 0,5 % Na-cholat (15) machen

Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C zentrifugierte man in beiden Fällen die trübe Lösung in der Ultrazentrifuge (38.000 xg, 60 min. 4 °C) klar. Der Überstand wurde mit einer ges. Ammoniumsulfatlösung (pH 7,0) unter sehr langsamer Zugabe (60 min.) bei 4 °C auf 35 % Ammoniumsulfat gebracht. Nach Zentrifugation (25.000 10 min, 4 °C) wurde der Überstand unter obigen Bedingungen auf 55 % Ammoniumsulfat gebracht. Danach ließ man die Probe noch 30 min. bei 4 °C inkubieren. Der durch eine weitere Zentrifugation (25.000 xg, 10 min, 4 °C) erhaltene Niederschlag wurde in 4 ml 250 mM Saccharose/ 50 mM Tricin-OH pH 8,0/ 0,5 mM PMSF/ 5 mM EACA/ 2 mM ATP gelöst und gegen 2 x 500 ml des gleichen Puffers 2-3 h dialysiert. Das dialysierte Enzym zentrifugierte man in einem 10-30 % Saccharosegradienten (Saccharose gelöst in 30 mM Tris- Succinat pH 6,5/ 0,2 % Triton X-100/ 0,1 % Asolectin/ 0,5 mM EDTA 0,1 mM ATP) im Vertikalrotor (TV 8 50, Du Pont) für 15,5 Stunden bei 58.000 xg und 4 °C. Beim Austropfen wurden 400 Mikroliter Fraktionen gesammelt. Die durch Aktivitätsmessungen ermittelten Amincon-Spitzenfraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Amincon, Membran XM 100) auf 1 ml eingengt. Das erhaltene Enzym ließ sich bei - 20 °C lagern.

18. SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese

Die gelelektrophoretische Charakterisierung von gereinigter ATPase und Zellrohextrakten erfolgte in 15 % SDS-Polyacrylamid-Flachgelen von 1,5 mm Dicke nach den Angaben von Laemmli (16). Die Elektrophorese erfolgte bis zum Einlaufen der Probe in das Laufgel

mit 100 Volt Spannung, anschließend wurde diese auf 200 V erhöht bzw. bei Läufen über Nacht auf 40 V erniedrigt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder einem "Western-Transfer" unterworfen oder mit 45,5 % Methanol/9,1 % Essigsäure/0,05 % CBB G-250 gefärbt und danach mit 7,5 % Essigsäure/ 5 % Methanol entfärbt.

19. Immunologische Methoden

In dieser Arbeit wurde gereinigter, SDS-denaturierter ATPase-Komplex als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Antigeninjektion wurde intramuskulär oder intravenös vorgenommen. Der Antikörpertiter wurde durch die Immundoppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony bestimmt.

a.) Immunisierung gegen SDS-denaturierten ATPase-Gesamtkomplex:

1 mg Enzym (3 mg/ml in 30 mM Tris-Succinat pH 6,5) wurde zur Denaturierung mit 99 % Mercaptoethanol und SDS-Puffer auf 5 % Mercaptoethanol und 3 % SDS gebracht und danach 5 Minuten gekocht. Bei der anschließenden 4 stündigen Dialyse gegen 5 l Na-Phosphat-Puffer pH 7,4/ 1 mM EDTA/ 0,1 % SDS wurde überschüssiges SDS und Mercaptoethanol entfernt. Die Probe wurde mit dem gleichen Volumen kompletten Freund'schen Adjuvans intensiv vermischt. Dabei war darauf zu achten, daß sich eine gleichmäßige Emulsion ausbildete. Die Emulsion wurde in den Hinterlauf des Kaninchens gespritzt. Nach 28 Tagen wurde nochmals die gleiche Menge Enzym mit inkompletten Freund'schen Adjuvans intravenös gespritzt. 7 Tage nach der letzten Injektion wurde 1 ml Blut aus der Ohrvene zur Titerbestimmung entnommen. Bei ausreichend hohem Titer mindestens 1:8) entnahm man den Tieren jeweils 30-40 ml Blut aus der Ohrvene. Nach einer Regenerationszeit von minimal 2 Wochen konnten "Booster"-Injektionen mit obiger Proteinlösung und inkompletten Adjuvans wiederum in den Hinterlauf vorgenommen werden. Nach vorheriger Titerbestimmung konnte jeweils 1 Woche nach jeder "Booster"-Injektion 30 - 40 ml Blut entnommen werden.

b.) Gewinnung von Antiserum:

Das entnommene Blut wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die koagulierten Erythrozyten wurden bei 900 xg 10 min. vom Blutplasma getrennt. Das Blutplasma konnte in dieser Form für den "Western-Blot" eingesetzt werden.

c.) Immundoppeldiffusionstest nach Ouchterlony (17):

Zur Testdurchführung wurde in das zentrale Loch des Ouchterlony-Testplättchens (18) 40 Mikroliter ATPase-Lösung (1 mg/ml in 30 mM Tris-Succinat pH 6,5) gegeben, während in den peripheren Löchern Antikörperlösungen in den Verdünnungen 1:2ⁿ (n = 0 bis 5) pipettiert wurden. Eine meist nach 24 Stunden sichtbare Immunreaktion ist eingetreten, wenn sich zwischen zentralem und peripherem Loch eine weiße Präzipitationslinie herausbildet. Als Titer bezeichnet man diejenigen Antikörperverdünnungen, die mit dem Antikörper eine gerade noch sichtbare Immun-Präzipitationslinie ausbildet.

20. ¹²⁵Jodierung von Protein A (19)

Um Protein A von *Staphylococcus aureus* (Pharmacia) mit ¹²⁵Jod zu markieren, wurde eine Sephadex G-25 Säule mit einem Bettvolumen von 9 ml oder äquivalent dazu eine Fertigsäule PD 10 (Pharmacia; Sephadex G-25) verwendet.

Die Säule wurde zunächst mit 25 ml 70 mM Barbiturat-Puffer (Na-5, 5-diäthylbarbiturat/HCl pH 8,6) äquilibriert und die Proteinbindungsstellen der Säule mit 60 mg Rinderserumalbumin, gelöst in 0,5 ml Barbituratpuffer, abgedeckt. Überschüssiges Rinderserumalbumin wurde mit 25 ml Äquilibrierungspuffer wieder ausgewaschen. Danach wurden 3 µl Na¹²⁵J (300 µCi), 10 µl 0,5 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5, 15 µl Protein A (75 µg) und 10 µl Chloramin T (4 mg/ml) in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5 zusammenpipettiert. Nach 5-7 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,86 ml Na-dithionit (314 µg/ml in 50 mM Na-Phosphatpuffer) gestoppt und dem Reaktionsansatz 100 µl KJ (1 mg/ml in 50 mM

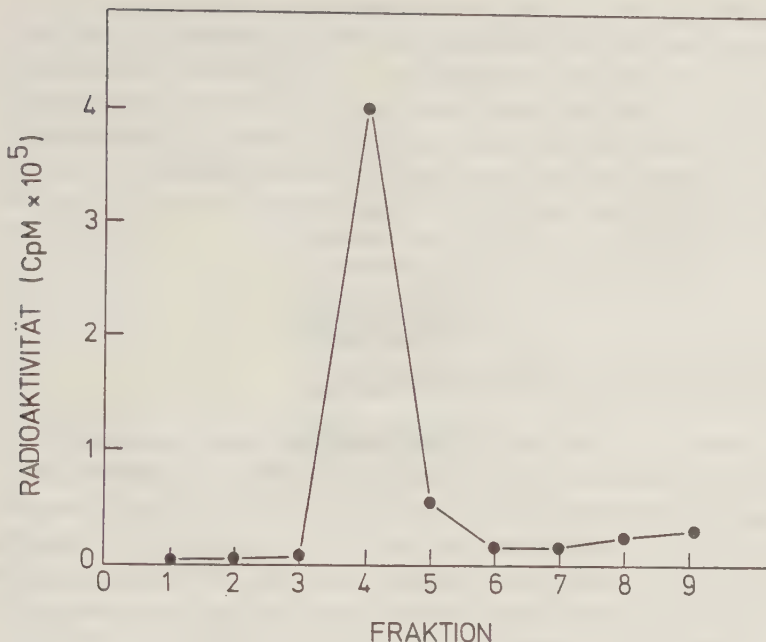


Abb. 2 Reinigung von ^{125}J -markiertem Protein A auf einer Sephadex G 25-Säule.

Nach der Markierungsreaktion wurde das Protein A von den im Reaktionsansatz vorhandenen Reagentien auf einer Sephadex G 25-Säule ($\varnothing$ 2 cm, Länge 10 cm) abgetrennt. Die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen (1ml) wurde durch Ausmessen von 1 μl -Proben jeder Fraktion im Szintillationszähler bestimmt. Das im Aus-schlußvolumen wandernde Protein A war meist in Fraktion 4 zu finden.

Phosphatpuffer pH 7,5) als Trägersubstanz beigegeben.

Das Gemisch wurde auf die Säule aufgetragen und mit 70 mM Barbitatpuffer eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen.

Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde quantitativ im Szintillationszähler bestimmt (s. Abb. 2) und die Hauptfraktion für die weiteren immunologischen Versuche verwendet.

Die spezifische Radioaktivität des markierten Protein A lag etwa bei $1-2 \times 10^8$ cpm/ml.

21. "Western-Blot" Hybridisierung (20)

Die in einem 15 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine eines Heferohextraktes wurden mit der in Abb. 3 dargestellten Anordnung auf Nitrozellulose übertragen. Zu Beginn des Transfers wurde die Stromstärke konstant bei 250 mA gehalten, bis eine Spannung von 60 V erreicht war. Danach hielt man die Spannung von 60V bis zum Ende des Transfers konstant. Die Transferdauer betrug hierbei gewöhnlich 60 Minuten.

Die nach dem Proteintransfer in Plastikfolie eingeschweißte Nitrozellulose wurde in 20 ml 8 % BSA in PBS für 1 Stunde vorinkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Antikörper (Titer 1:8) wurde das Nitrozellulosefilter mit der Antikörperlösung über Nacht bei 30 °C leicht geschüttelt. Durch anschließendes dreimaliges Waschen in je 250 ml PBS entfernte man die nicht spezifisch gebundenen Antikörper. Die Markierung der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte dann durch Zugabe von 6×10^6 cpm ^{125}J - markierte Protein A in 30 ml 8 % BSA in PBS. Das Filter wurde damit 2 Stunden lang bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Das nicht gebundene Protein A wurde danach durch 4 maliges Waschen mit PBS 1 % Triton X-100 entfernt. Nach dem Trocknen der Nitrozellulose bei 42 °C wurde der Filter auf einen Röntgenfilm (Fuji RX 100) gelegt und in einer Filmkassette bei -70 °C für eine Woche exponiert.

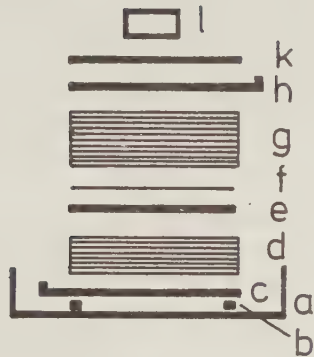


Abb. 3 Schematische Darstellung der Anordnung zum Proteintransfer aus SDS Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose

- a: Wanne
- b: Abstandshalter 3 mm
- c: Kathode
- d: 7 Lagen Whatmanpapier in 0,5 % SDS getränkt
- e: Polyacrylamidgel
- f: Nitrozellulose
- g: 24 Lagen Whatmanpapier (I) in Transferpuffer getränkt
- h: Anode
- k: Glasplatte
- l: Gewicht ungefähr 200 p

22. Darstellung von Zellrohextrakten aus pet-ts Mutanten für "Western-Blot"-Analysen

Atmungsdefiziente Hefemutanten wurden zunächst auf YEP-Festmedium ausplattiert und auf Revertantenfreiheit überprüft. Dann wurden 2 ml Lactat-Flüssigmedium mit einer Pickerspitze eines revertantenfreien Klons beimpft und bei Raumtemperatur auf der Rolltrommel inkubiert. Nach 24-48 Stunden wurden von diesen Kulturen 0,1 - 0,3 ml zum Beimpfen von 50 ml Galactose-Flüssigmedium entnommen und letztere bei 36 °C bis zu einer Zelldichte von ca. 200 KE geschüttelt. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (8000 UpM, JA 20-Rotor, 5 min.) geerntet und mit Tris-Acetat-Puffer pH 7,8 gewaschen. Der darauf folgende Zellaufschluß entspricht dem ersten Teil der Mitochondrien-Isolierungsmethode (s.o.). Der Überstand wurde nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (10 min, 1100 xg, 4 °C) sofort durch 5 % SDS, 3 % Mercapoethanol und anschließendes 5 min. Kochen denaturiert. Mit den so erhaltenen Proben wurde das Polyacrylamidgel für den "Western-Blot" beladen (200 Mikrogramm Protein pro Tasche). Diese Art des Aufschlusses erlaubte es, evtl. vorhandene cytoplasmatische ATPase-Vorstufen mitzuerfassen.

23. Isolierung von ura 3/pet-ts Doppelmutanten

Der S. cerevisiae- Stamm K 382-23 A (a, ade 2, ura 3) wurde auf YEP Festmedium ausgestrichen. Nach gutem Anwachsen wurde er mit pet-ts Mutanten durch Überstreichen gekreuzt und 2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 2 Tagen im Vorsporulationsmedium (flüssig) wurden die Zellen auf festes Sporulationsmedium übertragen. Nach einer Woche bei 30 °C war bei nahezu allen Stämmen Sporulation festzustellen. Um die Ascuswände abzubauen, wurde eine Pickerspitze sporulierter Zellen 15-30 min in einer Zymolyaselösung (0,004 mg Zymolyase/ ml Tris-HCL, pH 8,0) belassen. Die Suspension der dabei freigesetzten Sporen wurde mit sterilem Wasser verdünnt (Sporensuspension zweimal auf 5 ml auffüllen, mischen und das

Röhrchen jeweils gut ausgießen, nach nochmaligem Auffüllen auf 5 ml 0,2 ml der Verdünnung austreichen), auf YEP Festmedium ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Von diesen Sporenplatten wurden jeweils 36 der kleinsten Kolonien abgenommen und auf YEP Platten übertragen. Nach dem Anwachsen der Kolonien wurde von der YEP Platte auf Uracil-freies synthetisches Laktat-Komplettmedium gestempelt und bei 20 °C bzw. 36 °C inkubiert. Stämme, die sowohl pet-ts Mutanten als auch Uracil-bedürftig waren, wurden isoliert und gründlich auf die Stabilität beider Defekte getestet. Nur sehr stabile Doppelmutanten wurden für die Hefe-Transformation eingesetzt.

24. E. coli Transformation

50 ml LB-Medium wurde mit einem Einzelklon eines frisch ausgestrichenen E.coli-Stammes (RR1) beimpft und bei 37 °C bis zur logarithmischen Phase (25 Klettenheiten, Grünfilter) wachsen gelassen. Pro Transformationsansatz wurden 2 ml der Kultur geerntet (JA20-Rotor, 8000 Upm, 4 °C, 5 min.), in 1 ml 10 mM MOPS, 10 mM RbCl pH 7,0 resuspendiert und nochmals wie oben zentrifugiert, dann in 1 ml 0,1 M MOPS, 50 mM Calciumchlorid, 10 mM RbCl pH 6,5 vorsichtig suspendiert und 30 min. auf Eis gehalten. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Zellschlag durch Umstülpen des Zentrifugenglases auf Papiertücher getrocknet, in 0,2 ml 0,1 M MOPS, 50 mM Calciumchlorid, 10 mM RbCl pH 6,5 aufgenommen und 3 Mikroliter DMSO sowie maximal 10 Mikroliter DNA zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 30 sec. auf 43 °C erhitzt, 5 ml Z-Broth zugegeben. Die Zellen wurden 45 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert, danach bei 8000 Upm 5 min zentrifugiert. Nach der Resuspension in LB plattierte man die Zellen auf selektive Ampicillin-haltige Agarplatten aus. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C waren gewöhnlich die E. coli Klone deutlich zu sehen. Zur Kontrolle wurde eine Probe mit einer bekannten, gut transformierenden DNA in gleicher Weise behandelt.

25. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien sowohl in einem "Mini-Screen"-Verfahren für kleine Bakterienmengen, als auch für die präpartive Isolierung von Plasmid-DNA im Milligramm-Maßstab, wurde nach der von Birnboim et. al. (24) beschriebenen Methode durchgeführt.

a.) "Miniscreen"-Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien:

Die Zellen aus 1 ml einer 12 Stunden-Kultur eines Plasmid-haltigen E. coli Stammes in Antibiotikum-haltigen Medium wurden in einem Eppendorf-Reagiergefäß durch Zentrifugation (10.000 xg, 10 min 20 °C) geerntet. Die Zellen wurden in 100 µl 50 mM Tris-Cl pH 8,0/ 10 mM EDTA suspendiert und 200 µl einer frisch bereiteten Mischung von 0,2 M NaOH/ 1 % SDS zugesetzt. Nach Lyse der Zellen wurden 150 µl 5 M K-Acetat pH 4,8 zugegeben und die Mischung 3 min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000 xg, 1 min. 20 °C) wurden 360 µl abgehoben und in ein neues Reagiergefäß gegeben. Nach Auffüllen mit kaltem Ethanol (-20 °C) und Durchmischen wurde 5 min zentrifugiert (10.000 xg, 20 °C). Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in 100 µl 50 mM Tris-Cl pH 8,0/ 0,1 M Na-Acetat aufgenommen und mit 2,5 Vol. kaltem Ethanol gefällt. Nach 5 min Zentrifugation (10.000 xg, 20°C) wurde im Vakuum getrocknet und anschließend der Niederschlag in 50 µl Wasser gelöst. Diese DNA-Lösung kann bei 4 °C aufbewahrt werden.

b.) Isolierung von Plasmid-DNA aus 1 l-Kulturen von E. coli:

Mit einer Einzelkolonie frisch ausgestrichener E. coli Zellen wurde eine 3ml Kultur in Antibiotikum-haltigem Medium angelegt. Nach einem Tag Wachstum bei 37 °C wurde dieser Vorkultur 1l Antibiotikum-haltiges Medium angeimpft und die Kultur bis zu einer Zelldichte von 150-200 Klett-Einheiten (Grünfilter) bei 37 °C geschüttelt. Zur Amplifizierung der Plas-

mide wurde Chloramphenicol (Endkonzentration 120 µg/ml) zugesetzt und die Kultur weitere 12-16 Stunden bei 37 °C geschütelt. Die Zellen wurden in sterilen Zentrifugenbechern geerntet (5000 xg, 5 min, 4 °C) und in 70 ml 50 mM Tris-Cl pH 8,0/ 10 mM EDTA suspendiert. Unter Kühlen wurden 15 ml 0,2 M NaOH/ 1 % SDS (frisch zubereitet) zugegeben und nach Umschwenken die Suspension 3 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml K-Acetat pH 4,8 wurde weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000 xg, 15 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und 1,4 ml 5 M NaCl zugegeben. Nach Zusatz von 0,6 Vol. kaltem iso-Propanol (-20 °C) wurde die Mischung 1 Stunde bei -70 °C stehen gelassen. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden anschließend abzentrifugiert (12.000 xg, 20 min, 4 °C), der Überstand verworfen und der Niederschlag im Vakuum getrocknet. Nach Aufnahmen der Nukleinsäuren in 5 ml 50 mM Tris-Cl pH 8,0/10 mM EDTA wurden 50 µl RNase A (10 mg/ml, in 50 mM Na-Acetat pH 4,8, 10 min. gekocht) zugesetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde je einmal 1 Vol. Phenol (gesättigt mit 10 mM Tris-Cl pH 7,5/1 mM EDTA) und 1 Vol. Chloroform extrahiert. Zur Phasentrennung wurde jeweils zentrifugiert (6000 xg, 10 min, 20 °C). Die letzte wässrige Phase wurde 0,3 M an NaCl gemacht und die DNA wie oben mit 0,6 Vol. kaltem iso-Propanol (20 °C) gefällt. Nach Zentrifugation (12.000 xg, 20 min, 4 °C) wurde die DNA im Vakuum getrocknet und in 10 mM Tris-Cl pH 8,0/1 mM EDTA aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

26. Transformation von Saccharomyces cerevisiae (25)

Zur Transformation wurden die weiter oben erwähnten ura 3/ pet-ts Doppelmutanten eingesetzt. Die verwendeten Plasmide entstammten einer von F. Lacroute isolierten und uns zur Verfügung gestellten Hefegenbank (3). Diese Genbank war unter Verwendung des Vektors pFL 1 hergestellt worden und enthält eine partiell mit sau 3A gespaltene Hefe-DNA inseriert in die einzige Bam H1 Schnittstelle des Vektors (20).

Jeweils 20 ml YEP-Flüssigmedium wurde mit dem zu transformierenden Hefestämmen beimpft und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden in der Tischzentrifuge geerntet (2500 UpM, 3 min) mit SED gewaschen, in 10 ml des gleichen Puffers aufgenommen, mit 3,5 µl Mercaptoethanol versetzt und 10 min bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (2500 UpM, 2 min), zweimal in je 10 ml 1 M Sorbit gewaschen und in 10 ml SCE suspendiert. Von dieser Suspension wurden je dreimal 0,1 ml einer 10^{-4} und 10^{-5} Verdünnung auf Vollmedium-Agar ausplattiert. Der Zellsuspension wurden 0,1 ml Zymolyase (10 mg/ml) zugegeben und bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Das Fortschreiten der Sphäroplastierung wurde in regelmäßigen Abständen durch Mischen eines Tropfens der Zellsuspension mit einem Tropfen 2 % SDS auf einem Objektträger mikroskopisch verfolgt.

Beim Erreichen einer Konzentration von mehr als 90 % Sphäroplasten wurde 10^{-2} bis 10^{-3} -fach verdünnt und von der verdünnten Sphäroplasten-Suspension 0,1 ml auf Vollmedium zur Bestimmung des Anteils nicht sphäroplastierter Zellen ausplattiert. Die Sphäroplasten wurden nun in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (2500 UpM, 2 min), dreimal mit je 10 ml 1 M Sorbit, einmal mit 10 ml Calciumchlorid-Sorbit gewaschen und in 0,6 ml Calciumchlorid-Sorbit aufgenommen. Von 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} -fach verdünnten Suspension der Sphäroplasten in 1 M Sorbit wurden zur Bestimmung der Regenerationsfähigkeit 0,1 ml in 8 ml Regenerations-Topagar (s. unter Medien) eingegossen.

Die Sphäroplasten-Suspension wurde dann in 0,1 ml Portionen in Eppendorf-Hütchen verteilt, zu jeder Portion 20 µg (maximal 10 µl) DNA zugegeben und nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 1 ml PEG versetzt. Zur Kontrolle wurde zu jeweils einem Eppendorf-Hütchen keine DNA zugegeben. Alle Proben wurden im weiteren Verlauf des Versuches gleich behandelt. Nach weiteren 20 min bei Raumtemperatur wurden die Sphäroplasten abzentrifugiert, in 0,15 ml 1 M Sorbit, 6,5 mM Calciumchlorid, 33 % Vollmedium (YEP) aufgenommen, 20 min bei 30 °C inkubiert und zusammen mit je 8 ml TopAgar auf selektive Regenerationsplatten gegossen. Nach Festwerden des Agars wurden die Platten im Brutschrank bei 30 °C bis zum Auftreten von Kolonien (ca. 5 Tage) inkubiert.

27. Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe (26)

Pet-Transformanten von S. cerevisiae wurden in Reagenzgläsern in 5 ml Uracil-freiem synthetischen Komplettmedien über Nacht auf einer Rolltrommel angezüchtet, dann in einer Tischzentrifuge geerntet und in 0,5 ml SCE aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Hütchen transferiert, 8 Mikroliter Mercaptoethanol und 50 Mikroliter Zymolyase 60.000 (1 mg/ml in SCE-Puffer) zugegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach mindestens 90 % Sphäroplastierung wurde 10 sec zentrifugiert, das Zellsediment in 0,5 ml 0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA pH 8,0 resuspendiert und nach Zugabe von 0,1 ml Proteinase K (1 mg/ml in 0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, pH 8,0) und 0,05 ml 20 % SDS 3-4 Stunden bei 37 °C und anschließend 20 min bei 60 °C inkubiert.

Das Lysat wurde dann mit 1 Vol. PCI (Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol 49:49:1) extrahiert, nach Trennung der Phasen (20 sec. Zentrifugation) die wässrige Phase mit 2 Vol. -20 °C kaltem Ethanol versetzt und nach kurzem Mischen die ausgefällten Nukleinsäuren abzentrifugiert (5 min.). Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet, in 0,5 ml TE-Puffer gelöst, 2 Mikroliter RNase A (10 mg/ml in 50 mM Na-Acetat pH 4,8, durch 5 min. Kochen und Abschrecken auf Eis zur Inaktivierung von DNase Aktivität vorbehandelt) zugegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann wurde mit 1 Vol. CI (Chloroform: Isoamylalkohol 24:1) ausgeschüttelt und die DNA, wie oben beschrieben, mit Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet und in 50 Mikrolitern TE-Puffer gelöst; die so isolierte DNA reichte aus für 4-5 Restriktionsverdauungen.

28. Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA (27)

Zu Restriktionsspaltungen wurden sowohl in Einfach- wie auch in

Mehrfachverdauungen 1 μ g DNA mit jeweils 1,5 U der gewählten Restriktionsendonuklease(n) in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l verwendet. Die Ansätze enthielten 33 mM Tris-Cl pH 7,9/66 mM K-Acetat/ 66 mM Na-Acetat/ 10 mM Mg-Acetat/0,5 mM DTT und 0,1 mg/ml BSA und wurde für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Verdauungsgemisch 5 min auf 65 °C erhitzt und danach auf Eis abgeschreckt.

29. Agarosegel-Elektrophorese von DNA-Proben

DNA-Proben wurden zur Restriktionsanalyse und Größenbestimmungen in Horizontalgelen (24 x 16 x 0,6 cm) der Zusammensetzung 0,5 % Agarose/ 1 x TBE mit 35 V für 16 Stunden elektrophoretisiert. Nach 15 min Färben mit EtBr-Lösung (1 μ g/ml in dest.Wasser) und 15 min Entfärben mit dest.Wasser wurden die Gele unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht photographiert (Polaroid MP 4, Film 665). Als Proben für die Elektrophorese dienten restriktionsgespaltene DNA's (s. 28) oder unverdaute DNA im Volumenbereich von 15 - 20 μ l, der 2 μ l 50 % Glycerin/ 0,03 % Bromphenolblau/ 0,03 % Xylencyanol zugesetzt wurden. Die Taschengröße im Gel betrug 1 x 8 x 4 mm.

Zur gleichzeitigen elektrophoretischen Charakterisierung vieler verschiedener Plasmid-DNA's aus Klonierungsexperimenten wurden kleine Horizontalgele (8 x 8 x 0,5 cm) der Zusammensetzung 0,8 % Agarose/ 1 x TBE mit 15 Bahnen verwendet und nach Elektrophorese und EtBr-Anfärbung wie oben photographiert.

III E r g e b n i s s e

A. Aktivitätsbestimmung der Atmungskettenenzyme in pet-ts Mutanten verschiedener Komplementationgruppen.

Ein erster Schritt zur biochemischen Charakterisierung der am Institut zur Verfügung stehenden Sammlung Lactatnegativer pet-ts Mutanten war die enzymatische Untersuchung der Atmungskettenenzym-Aktivitäten in ihnen. In Kombination mit den bekannten Komplementationseigenschaften der Mutanten (1) sollte es dadurch möglich sein, genspezifische Enzymdefekte zu ermitteln.

Besonderes Augenmerk sollte dabei in der vorliegenden Arbeit auf die Charakterisierung spezifischer, ATPase-negativer Mutanten gerichtet werden.

Vor dem Beginn der systematischen Reihenuntersuchungen war es allerdings nötig, durch geeignete Vorversuche eine Reihe experimenteller Parameter zu überprüfen und, wenn nötig, zu optimieren. Einige dieser Voruntersuchungen waren bereits von anderen Mitarbeitern des Instituts durchgeführt worden. (9, 28). Soweit solche Vorversuche im Rahmen dieser Arbeit erfolgten, werden sie im folgenden beschrieben.

1.) Zeitliche Veränderungen der Atmungskettenenzym-Aktivitäten bei der Anzucht von Wildtyp-Hefezellen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Es ist bekannt, daß Aktivitäten und Mengen bestimmter Enzyme im Zellzyklus und damit auch im zeitlichen Verlauf des Wachstums einer Hefekultur Schwankungen unterworfen sind. Daher ist es nötig, um zu vergleichbaren Daten zu gelangen, den zeitlichen Verlauf der Atmungskettenenzym-Aktivitäten in Wildtyp-Mitochondrien zu kennen. Weiterhin ist die Beeinflußbarkeit dieser Enzym-Aktivitäten durch die verwendete Kohlenstoffquelle bekannt (Glukoserepression! 29).

Die Vorversuche zur Optimierung der Anzuchtbedingungen unter Verwendung der am besten geeigneten Kohlenstoffquelle wurden mit dem S. cerevisiae-Stamm SC 167 (Laktatpositiv) durchgeführt. Aus diesem Stamm waren auch alle pet-ts Mutanten hergestellt worden. In Abb. 4 und 5 sind die Messungen zur Bestimmung der Atmungsrate und der verschiedenen Teilaktivitäten der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung im Verlauf der Anzucht von Wildtyp-Zellen in Lactatmedium bei 22 °C wiedergegeben. Die Enzymaktivitäten einschließlich der Atmungsrate erreichen offensichtlich alle im zweiten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase ein Maximum und nehmen nach Erreichen der stationären Phase mehr oder weniger deutlich ab.

Ähnliche Ergebnisse finden sich bei der Anzucht von Wildtypzellen bei 36 °C. Außer der geänderten Temperatur wurden in dieser Versuchsreihe auch eine Reihe verschiedener Kohlenstoffquellen als Wachstumsgrundlage untersucht. (Abb. 6). Alle Kulturen wurden zum Zeitpunkt Null mit einer Probe aus einer stationären 22 °C Lactat-Kultur beimpft. Die Aktivitäten dieser Probe wurden als Anfangswert (= 100 %) in die Kinetiken eingesetzt. In Abb. 7 ist der zeitliche Verlauf der Atmungskettenenzym-Aktivitäten in Wildtyp-Zellen bei der Anzucht auf 1 % Galaktose, 1% Glukose und 1 % Saccharose bzw. 3 % Lactat wiedergegeben.

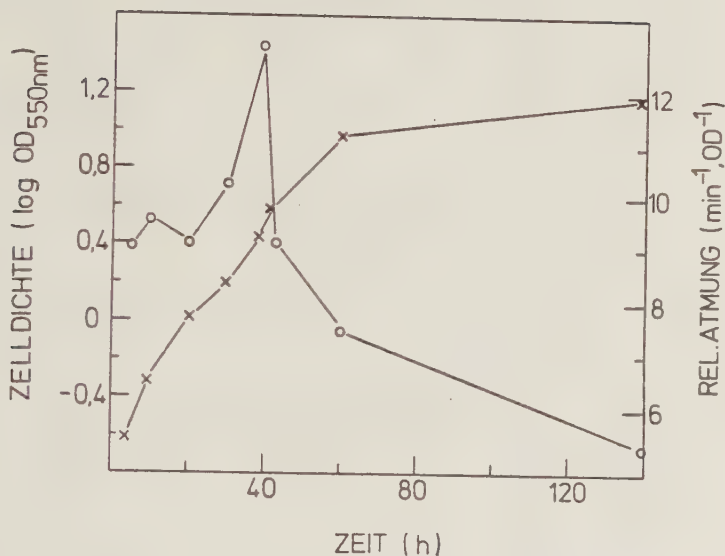


Abb. 4 Zeitliche Veränderung von Atmungsrate und Zelldichte bei Anzucht von Wildtyp-Hefe in Lactat-Medium bei 22° C.

Wildtyp-Hefe wurde in 1 Liter Lactat-Medium bei 22° C unter Schütteln kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und damit die Atmungsrate (o) und Zelldichte (x) bestimmt.

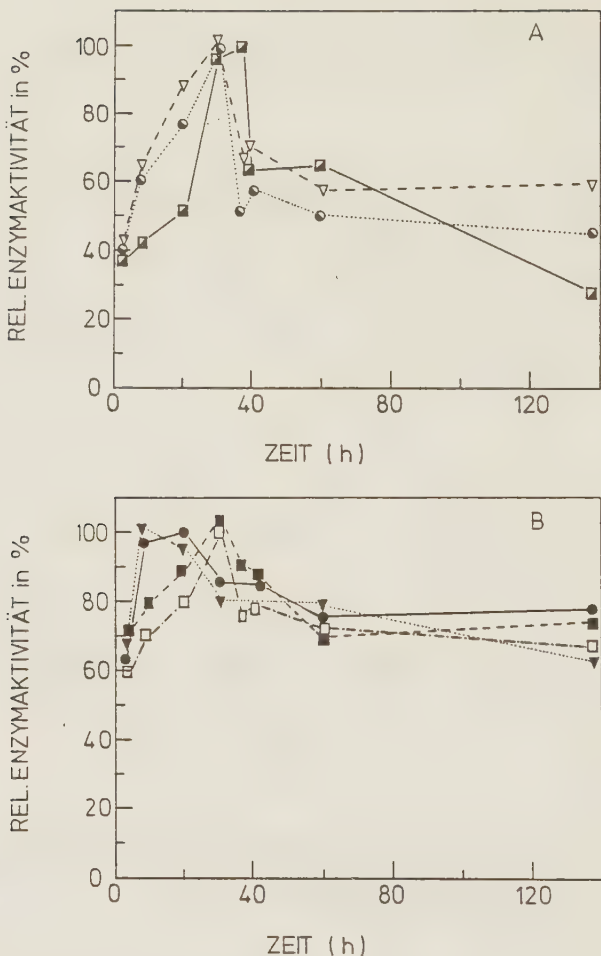


Abb. 5 Zeitliche Veränderungen der Aktivitäten von Teilenzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in Wildtyp-Hefe bei Anzucht in 22° C Lactat-Medium.

Zellenanzucht und Probenentnahme erfolgte wie in Abb.4 beschrieben. Aus den durch Zentrifugation geernteten Zellen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, submitochondrielle Partikel isoliert. Mit diesen wurden die Aktivitäten der Anzyme Cytochromoxidase (■), NADH: Cyt.c-Oxidoreduktase (●), Succinat: Cyt.c-Oxidoreduktase (▽), NADH:Q-Oxidoreduktase (▼), Succinat-Dehydrogenase (●), Gesamt (□) und oligomycinsensitive (■) ATPase bestimmt. Die jeweiligen Maximalaktivitäten wurden hierbei zu 100 % gesetzt.

Bei Verwendung von 1% Saccharose oder Galaktose sinken - mit Ausnahme der Succinat-Dehydrogenase alle Enzymaktivitäten im Verlauf der Kultivierung deutlich unter 50% Ausgangsaktivität ab. Der Aktivitätsabfall im Glukose-Medium ist, wenn überhaupt, wesentlich weniger deutlich ausgeprägt. Im Lactat-Medium wird zunächst, mit Ausnahme der Cytochromoxidase, eine Aktivitätssteigerung und erst dann eine Abnahme der Teilenzym-Aktivitäten festgestellt. Succinat-Dehydrogenase und Cytochromoxidase unterscheiden sich insofern von den übrigen Teilenzymen, als in einem Fall (Cytochromoxidase) in allen Medien ein rascher, im anderen Fall (Succinat-Dehydrogenase) in allen Medien kaum ein Aktivitäts-Abfall bei 36 °C Kultivierung beobachtet wurde. Die geschilderten Daten zeigen, daß im Bereich zwischen 0 und 25 Stunden die auf 1 % Galaktose wachsenden Kulturen, abgesehen von den Lactat-Kulturen, den geringsten Aktivitätsverlust aufweisen. Bei den Lactat-Kulturen muß berücksichtigt werden, daß die zu untersuchenden pet-ts Mutanten bei 36 °C in Lactat-Medium nicht mehr wachsen. Daher scheidet ein solches Medium für die Routineuntersuchung der Mutanten aus. In Anbetracht des oben erwähnten Wachstumsverhaltens und der Gefahr einer möglichen Glukose-Repression erschienen uns somit das 1 %ige Galaktose-Medium für die Anzucht der Mutanten am geeignetsten.

2.) Inaktivierungskinetiken der Atmungsketten-Enzyme bei verschiedenen pet-ts Mutanten.

In einer weiteren Reihe von Vorversuchen wurden Inaktivierungskinetiken der Atmungskettenenzym-Aktivitäten von verschiedenen pet-ts Mutanten bei Kultivierung in 1 % Galaktose-Medium unter nicht permissiven Bedingungen (36 °C) erstellt. Abb. 8 zeigt die Inaktivierungskinetiken von 6 unterschiedlichen Enzymen der mitochondriellen Atmungskette bei 7 pet-ts Mutanten. Es fällt auf, daß bei allen Mutanten nach spätestens 48 Stunden Wachstum

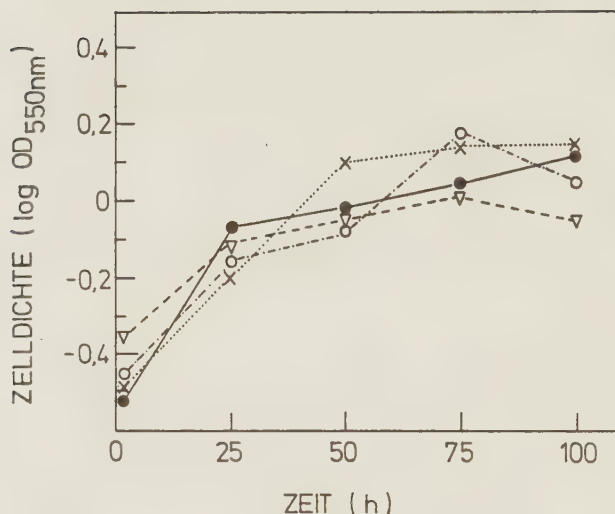


Abb. 6 Wachstumskinetik von Wildtyp-Hefe (SC 167)
bei Kultivation auf verschiedenen Kohlen-
stoffquellen

Wildtyp-Hefe wurde bei 36° C in 3 % Lactat-Medium (x), 1 % Galaktose-Medium (o), 1 % Glukose-Medium (●) und 1 % Saccharose-Medium (▽) unter starkem Schütteln kultiviert. Als Kulturgefäße dienen entweder 1,5 Liter Fernbach-Kolben oder 2 Liter Erlenmeyer-Kolben.

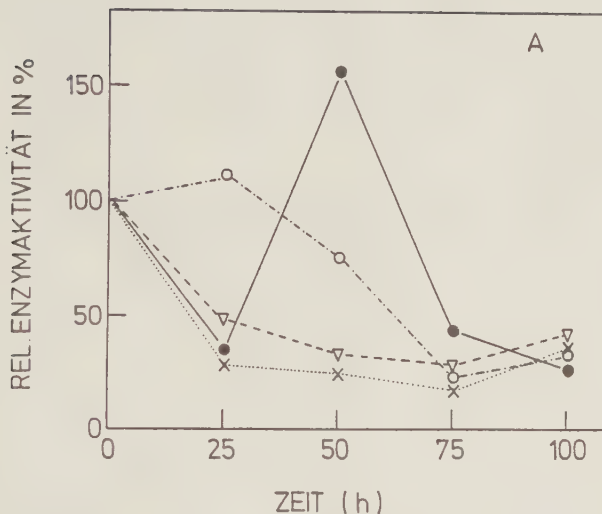


Abb. 7 Zeitliche Veränderung der Aktivitäten von Teilenzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in Wildtyp-Hefe bei Kultivierung auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Zellanzucht und Probenentnahme erfolgte wie in Abb. 6 beschrieben. Aus den geernteten Zellen wurden submitochondrielle Partikel isoliert (siehe Material und Methoden) und an diesen die Aktivität der Cytochromoxidase (A), NADH:Cyt.c-Oxidoreduktase (B), Succinat: Cyt.c-Oxidoreduktase (C), NADH:Q-Oxidoreduktase (D), Succinat Dehydrogenase (E), Gesamt- (F) und oligomycinsensitive ATPase (G) gemessen. Die jeweiligen Aktivitäten wurden bei $t = 0$ h zu 100 % gesetzt. Bezüglich der verwendeten Symbole siehe Abb. 6.

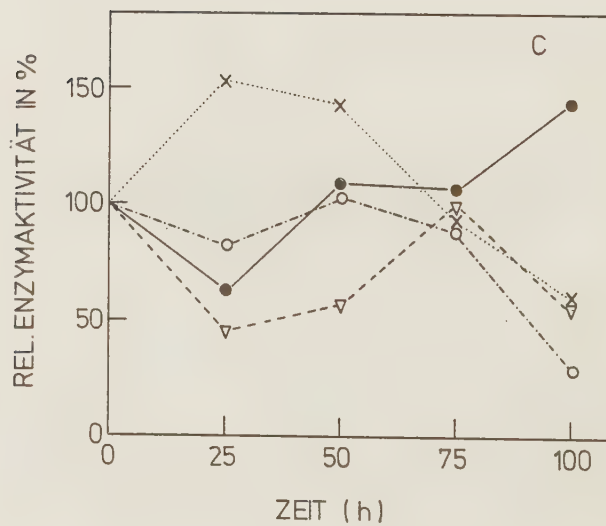
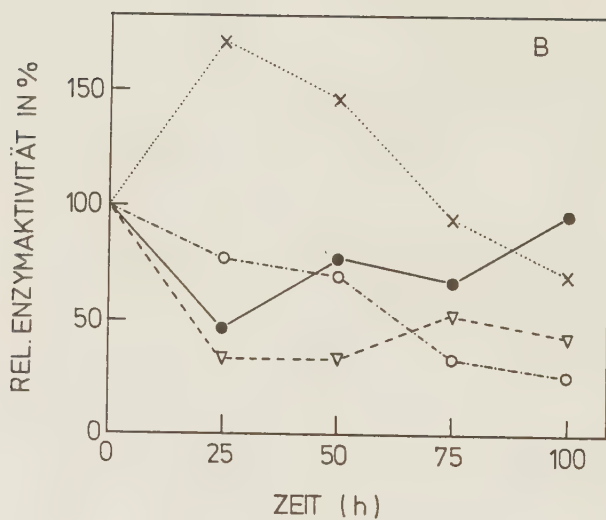


Abb. 7 (Fortsetzung)

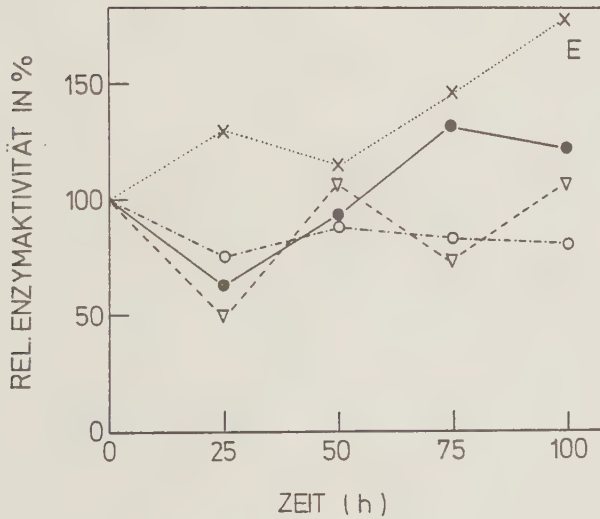
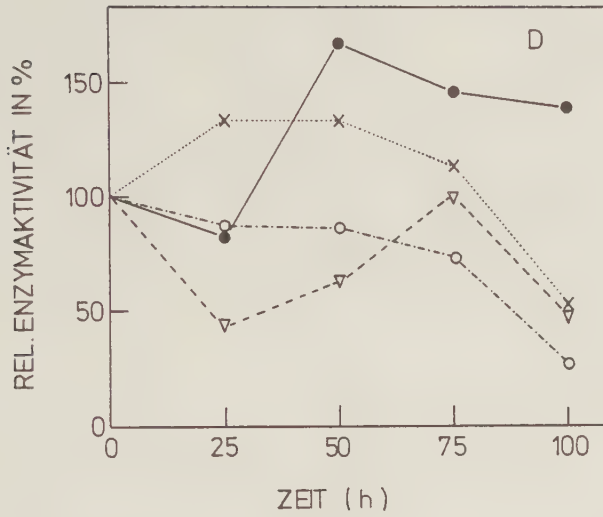


Abb. 7 (Fortsetzung)

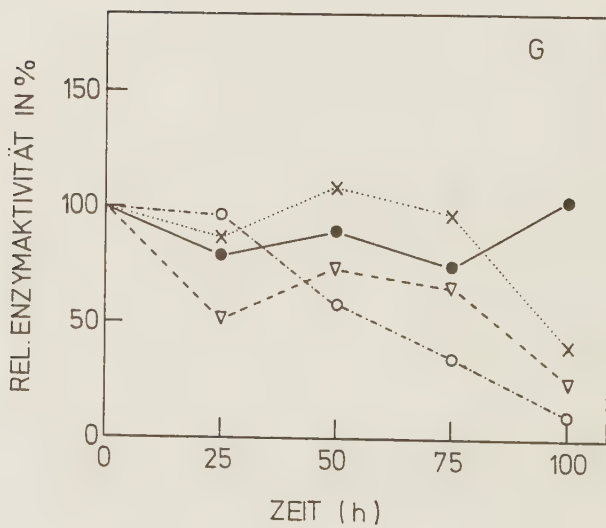
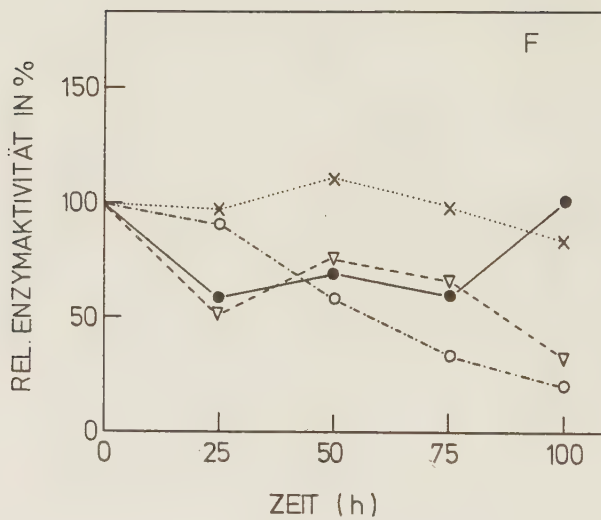
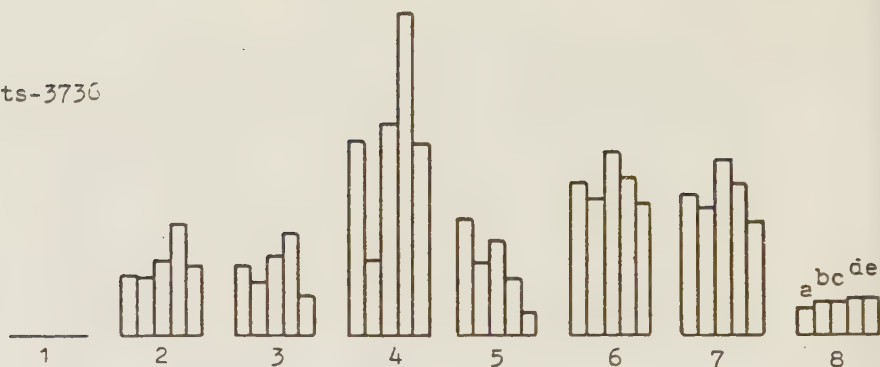


Abb. 7 (Fortsetzung)

unter nicht permissiven Bedingungen mindestens ein Enzym der Atmungskette deutlich verringerte Aktivität zeigt. Diese spezifischen, nach kurzer Zeit schon auftretenden Aktivitätsverringierungen einzelner Enzyme unterscheiden sich gewöhnlich deutlich von später einsetzenden und damit wahrscheinlich unspezifischen Aktivitätsveränderungen anderer Enzyme. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Mutante ts 2081. Die Cytochromoxidase-Aktivität ist hier alsbald stark reduziert bzw. Null, während in den ersten 48 Stunden der Anzucht die anderen Enzyme noch nahezu normale Aktivitätswerte behalten. (vgl. Abb. 8). Allerdings weitet sich der spezifische Defekt nach längerer Inkubationszeit bei nicht permissiver Temperatur zu einem pleiotropen Defekt aus.

Nach 96 Stunden sind die meisten Aktivitäten bei ts 2081 unter 20 % der Ausgangs-Aktivität abgesunken. Anders verhält sich dagegen die Mutante ts 3418. Die Cytochromoxidase ist auch hier nach kurzer Zeit völlig verschwunden, während die Enzyme NADH: Cyt.c Oxidoreduktase, NADH: Q Oxidoreduktase über 72 Stunden bei 36 °C ihre Aktivitäten im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant behalten (vgl. Abb. 8). Die Enzyme Succinat- Dehydrogenase und Succinat: Cyt. c Oxidoreduktase wurden bei dieser Mutante - wenn auch deutlich langsamer als die Cytochromoxidase - ebenfalls allmählich inaktiviert. Schwieriger zu beurteilen ist die Mutante ts 330, die nach 48 Stunden ein pleiotropes Defektmuster aufweist. Man misst hier eine kontinuierliche Abnahme aller Enzym-Aktivitäten mit Ausnahme der Cytochromoxidase-Aktivität, die sofort verschwindet. In solchen Fällen ist es schwer zu entscheiden, ob die letztlich beobachtete Pleiotropie die sekundäre Folge des Ausfalls einer bestimmten, primär betroffenen Funktion ist, oder ob die Mutation ursächlich sofort einen pleiotropen Phänotyp zur Folge hat. Beim Vergleich der Inaktivierungskinetiken von Gesamt-ATPase und oligomycinsensitiver ATPase bemerkt man, daß die Inaktivierungsmuster in den untersuchten Mutanten qualitativ sehr ähnlich sind. Es befinden sich offensichtlich unter den in

ts-3736



ts-3757

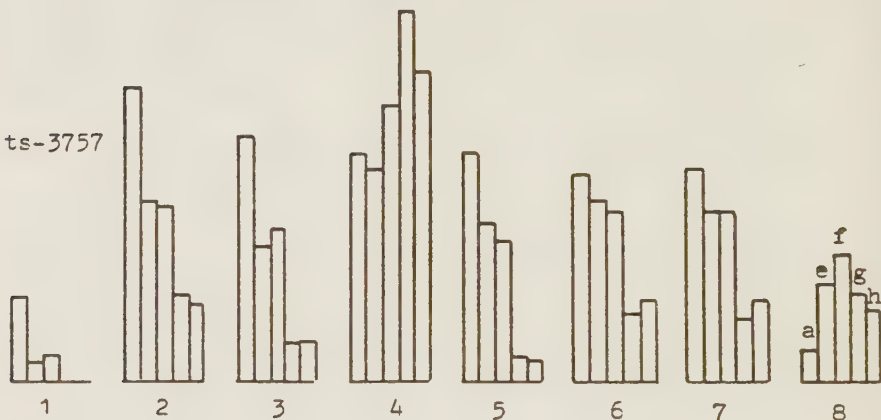
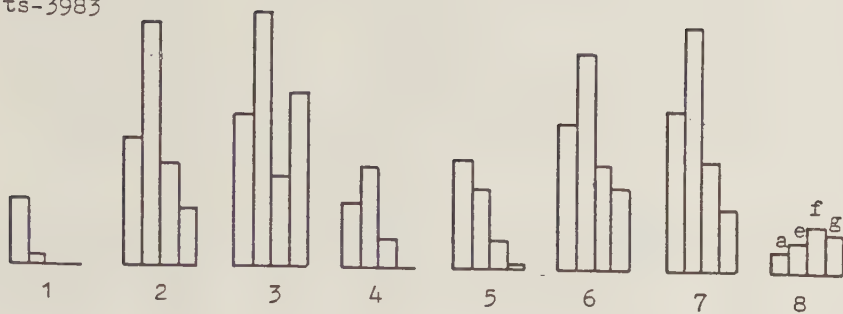


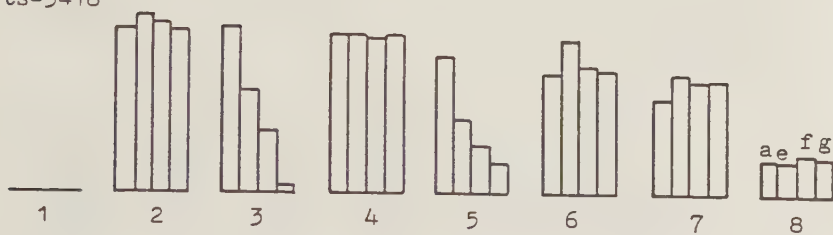
Abb. 8 Inaktivierungskinetiken der Atmungskettenenzyme von verschiedenen pet-ts Mutanten bei Kultivation unter nicht permissiven Bedingungen.

Die pet-ts Mutanten wurden in 1 % Galaktose-Medium (1 Liter) bei 36° C kultiviert. Nach 0 (a), 3 (b), 6 (c), 12 (d), 24 (e), 48 (f), 72 (g) und 96 (h) Stunden wurden Proben (100-200 ml) entnommen, Zelldichten (8) bestimmt und an isolierten submitochondriellen Partikeln die spezifischen Aktivitäten der Enzyme Cytochromoxidase (1), NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase (2), Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase (3), NADH: Q Oxidoreduktase (4), Succinat-Dehydrogenase (5), Gesamt- (6) und Oligomycin-sensitive (7) ATPase gemessen. Die graphische Auftragung gibt die auf die jeweiligen Wildtyp-Aktivitäten (= 100 %) bezogenen relativen Meßwerte wieder.

ts-3983



ts-3418



ts-1475

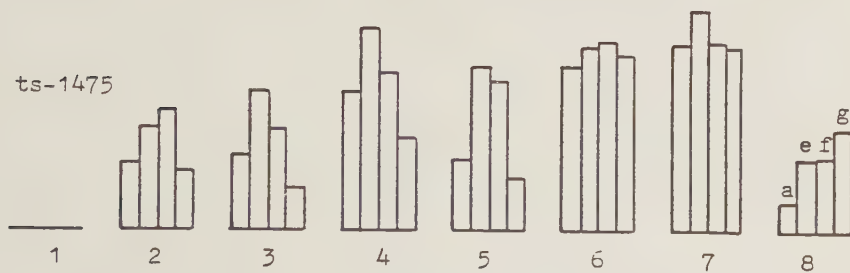
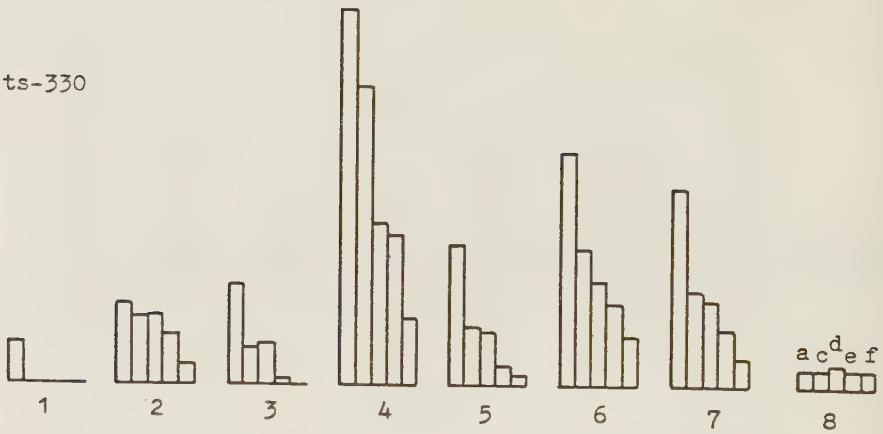
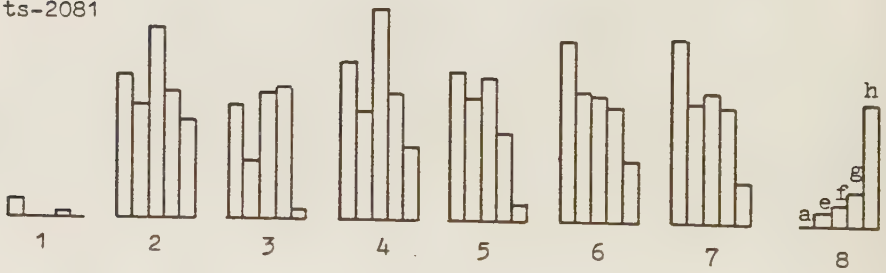


Abb. 8 (Fortsetzung)

ts-330



ts-2081



ts-4094

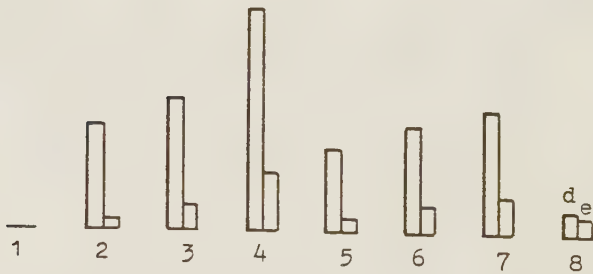


Abb. 8 (Fortsetzung)

Abb. 8 aufgeführten Mutanten keine, die einen spezifischen ATPase- Defekt enthalten. Allgemein erlauben die in Abb. 8 dargestellten Ergebnisse einmal - anhand der Diskontinuität aufeinander folgender Meßwerte - eine Abschätzung der Meßgenauigkeit der einzelnen Enzymtests. Zum anderen bestätigt die trotz allem deutliche Kontinuität der zeitlichen Aktivitätsveränderungen die notwendige Zuverlässigkeit der verwendeten Testmethoden.

3.) Routinemäßiges Durchtesten von pet-ts Mutanten aus 180 verschiedenen Komplementationsgruppen.

Für die Suche nach spezifischen Enzymdefekten bei einer größeren Zahl von Mutanten wurden allgemein die weiter oben beschriebenen, durch Vorversuche ermittelten Kulturbedingungen verwendet (1% Galaktose, 36 °C, 36 h). Die Mutanten wurden jeweils in 1/10 Volumen Lactatmedium (bezogen auf die Hauptkultur in Galaktosemedium) 12 Stunden bei 22 °C vorgezüchtet. Dadurch sollte eine Verringerung des Gehaltes an rho- Zellen und eine Ausschaltung der Katabolitrepression zum Zeitpunkt des Kultivationsbeginns erreicht werden. Revertantengehalt und rho-Anteil jeder Kultur wurden nach der Anzucht genau bestimmt. Es wurden nur solche Mutanten enzymatisch untersucht, deren Revertantenanteil möglichst klein (kleiner 10 %) war. In Tab. 1-8 sind 183 Mutanten aus 180 Komplementationsgruppen aufgelistet, welche auf die Weise angezüchtet und im einzelnen untersucht wurden. Man kann die dabei gemessenen Enzym-Defektmuster in folgender Weise zusammenfassen:

- 1.) Spezifischer Defekt der Cytochromoxidase bei 47 Mutanten (Tab. 1). Die anderen Aktivitäten haben in dieser Gruppe Wildtypcharakter. Ein Beispiel ist ts 892.
- 2.) Cytochromoxidase fehlt oder ist verringert und eine der folgenden Aktivitäten ist gleichzeitig vermindert (Tab.2):

- a) Cytochromoxidase/Succinat-Cyto-Oxidoreduktase:
In dieser Gruppe findet man 19 Mutanten. Ein Vertreter ist ts 310.
 - b) Cytochromoxidase/NADH - Q Oxidoreduktase-Defekt:
Es existieren zwei Mutanten, ts 575 und ts 4847.
 - c) Cytochromoxidase/Succinat-Dehydrogenase:
Man findet drei Mutanten. Dies sind ts 345, ts 2635 und ts 3736.
 - d) Cytochromoxidase/ATPase Inaktivierung:
Die Gruppe umfaßt 7 Mutanten, wobei sowohl eine Verminderung der Oligomycin-empfindlichen (ts 4281), als auch der Gesamt-ATPase (ts 1666) beobachtet wurde.
- 3.) Ein Defekt der Cytochromoxidase und zweier weiterer Enzyme wurden in folgenden Mutanten beobachtet (Tab. 3):
- a) Cytochromoxidase/Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase/ATPase Defekt:
Der einzige Vertreter ist ts 4842.
 - b) Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat Cytochrom c Oxidoreduktase:
In dieser Gruppe gibt es 16 Vertreter. Ein Beispiel ist ts 1527.
 - c) Cytochromoxidase/Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat Dehydrogenase:
Man findet 11 Mutanten, ein Vertreter ist ts 3840.
- 4.) Ein vollständiger Defekt von Cytochromoxidase und die deutliche Verringerung dreier weiterer Aktivitäten wurden in folgenden Mutanten beobachtet (Tab. 4):
- a) Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat Dehydrogenase/ATPase:
Eine der 12 Mutanten dieser Art ist ts 330.
 - b) Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase:

Tab. 1 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Spezifischer Defekt der Cytochromoxidase.
Bzgl. Testmethoden und Anzuchtbedingungen s. Material und Methoden 13 und 15

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxidoreduktase	ATPase Gesamt Oligomycin- empfindlich
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
SC 167	164	244	193	585	1294	6620 4560
ts- 172	27	114	126	171	522	2661 1710
ts- 313	62	225	125	396	2573	8570 5270
ts- 370	--	349	217	271	950	4498 2341
ts- 390	--	148	116	246	1753	4754 3250
ts- 571	43	263	164	407	903	4940 3480
ts- 642	--	317	128	180	1991	6432 5430
ts- 645	--	175	121	269	894	7056 4473
ts- 771	85	174	169	501	1682	6010 4470
ts- 794	--	200	101	281	1010	2602 1836
ts- 892	--	244	165	300	1218	6272 4340
ts-1037	94	502	316	570	2647	9406 5820
ts-1039	--	122	219	490	1982	4803 4085
ts-1121	56	209	393	419	1812	5365 4397

(Fortsetzung S.64)

Tab. 1 (Fortsetzung)

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxidoreduktase	ATPase
	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹					
ts-1160	--	221	152	196	586	4257
ts-1285	6	92	99	654	1000	7049
ts-1369	--	124	213	378	3298	6437
ts-1497	23	276	190	279	1491	4298
ts-1548	--	259	122	264	1529	6135
ts-1584	--	204	109	209	2426	4491
ts-1649	--	178	227	365	1488	3634
ts-1689	--	134	121	378	1655	3497
ts-1749	--	239	152	357	2340	6149
ts-1778	5	207	126	201	927	3868
ts-1930	--	191	126	238	2797	3908
ts-2061	13	158	176	349	898	3878
ts-2249	--	369	221	324	1062	5982
ts-2326	12	113	144	526	2051	5901
ts-2615	10	332	240	531	1434	8857
ts-2639	--	393	214	291	2122	6049
ts-2640	--	155	112	361	1687	5537
ts-2669	61	155	151	410	584	4779

(Fortsetzung S. 65)

Tab.2 (Fortsetzung)

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	ATPase Gesamt Oligomycin- empfindlich
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
ts-3640	28	169	98	167	1836	4719 1927
ts-4284	--	97	51	159	1635	4246 3021
ts-4683	34	195	88	112	1432	4966 3211
ts-4714	71	32	18	55	1039	8372 6081
ts-5019	--	109	78	192	943	3538 1768

(b) Cytochromoxidase/NADH-Q Oxidoreduktase.

ts- 575	--	163	194	844	586	4537 2799
ts-4847	35	94	110	194	118	4815 3378

(c) Cytochromoxidase/Succinat-Dehydrogenase.

ts- 345	84	167	170	145	1495	3733 1360
ts-2635	36	174	139	128	2525	6044 4322
ts-3736	--	394	151	24	577	3447 1444

(Fortsetzung S.68)

Tab.2 (Fortsetzung)

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	ATPase
					Gesamt	Oligomycin- empfindlich
(d) <u>Cytochromoxidase/ATPase.</u>						
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
ts- 841	23	175	143	558	1957	1035
ts-1113	--	213	163	755	787	1658
ts-1305	44	225	217	424	1087	105
ts-1666	--	98	109	243	179	1153
ts-2789	16	158	142	154	851	405
ts-3910	--	114	110	329	1670	171
ts-4281	44	262	164	833	1954	1167

Tab.3 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Cytochromoxidase ist defekt und 2 weitere Enzymaktivitäten sind verringert.
Bzgl. Testmethoden und Anzuchsbedingungen s. Material und Methoden 13 und 15

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxidoreduktase	ATPase Gesamt Oligomycin- empfindlich
nmol min ⁻¹ mg ⁻¹						
(a) <u>Cytochromoxidase/Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase/ATPase.</u>						
ts-4842	--	109	26	428	1684	1663 851
(b) <u>Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase.</u>						
ts-1035	--	48	67	810	1394	9650 6990
ts-1147	--	24	17	280	883	3872 2232
ts-1475	--	47	39	206	1705	4289 3118
ts-1527	--	31	51	397	1505	2285 2252
ts-1786	--	90	56	156	956	3457 1961
ts-2262	15	85	73	136	1222	3444 2027
ts-2431	--	42	23	145	2140	5869 3094
ts-2754	19	79	37	142	1402	4936 3834
ts-2820	--	52	63	255	2523	3886 2027

(Fortsetzung S.70)

Tab.3 (Fortsetzung)

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ublchiron Oxidoreduktase	ATPase Gesamt Oligomycin- empfindlich
			nmol min ⁻¹ mg ⁻¹			
ts-2897	--	54	45	203	1280	2660
ts-3065	--	37	54	292	1007	3937
ts-3224	--	13	24	131	1721	2267
ts-3766	8	62	85	228	778	3115
ts-4336	48	85	99	181	826	2252
ts-4363	15	79	66	157	808	2525
ts-4808	8	93	94	457	1748	2410

(c) Cytochromoxidase/Succinat-Dehydrogenase/Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase.

ts- 621	37	113	96	135	1112	2695
ts- 912	--	109	22	64	1303	2670
ts-2061	--	217	49	65	1955	2912
ts-2081	--	243	40	69	1530	1677
ts-2256	35	154	65	102	1625	1890
ts-3200	--	185	73	79	1678	5081
ts-3418	--	208	49	38	1015	1870

(Fortsetzung S.71)

Tab. 3 (Fortsetzung)

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	ATPase
						Gesamt Oligomycin- empfindlich
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
ts-3348	--	138	54	39	1665	2887 2573
ts-3639	--	247	88	91	1731	6859 4763
ts-3840	--	137	15	19	618	3578 2424
ts-5155	--	125	89	81	2075	3917 2748

Tab. 4 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Cytochromoxidase ist defekt und 3 weitere Enzymaktivitäten sind verringert.
Bzgl. Testmethoden und Anzuchsbedingungen s. Material und Methoden 13 und 15

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Dehydrogenase	NADH: Ubichinon Oxidoreduktase	ATPase Gesamt Oligomycin-empfindlich

(a) Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase/ATPase.
nmol min⁻¹ mg⁻¹

ts- 330	--	327	73	126	2116	2628	1164
ts-1138	21	91	95	478	1523	889	180
ts-1342	7	36	157	91	993	155	82
ts-1714	--	101	--	45	997	1582	770
ts-1976	31	58	243	37	1490	2308	311
ts-2135	--	94	44	41	2114	1713	1223
ts-2263	7	134	61	65	1019	2636	1588
ts-2711	--	194	--	135	647	1039	193
ts-2950	23	172	--	185	1255	1487	540
ts-3069	--	107	51	171	1401	2534	1147
ts-3560	54	179	154	98	1391	2536	591
ts-3817	31	231	28	192	1216	724	145

(Fortsetzung S.73)

Tab.4 (Fortsetzung)

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon- Oxido- reduktase	ATPase Gesamt Oligomycin- empfindlich
nmol min ⁻¹ mg ⁻¹						
(b) <u>Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase/ Succinat-Dehydrogenase.</u>						
ts- 298	--	45	20	81	795	3940
ts- 337	--	53	57	155	2183	1909
ts- 348	--	72	37	93	1270	3174
ts- 353	38	79	30	153	1034	2135
ts- 820	--	84	35	298	1742	2259
ts-1549	--	24	62	217	890	4100
ts-1699	9	100	29	50	1170	5280
ts-2178	--	74	49	115	1252	5824
ts-2603	--	92	37	88	1770	3475
ts-2661	--	29	--	164	1041	1031
ts-2838	--	48	24	85	1242	3004
ts-3573	--	60	52	267	2665	3098
ts-3757	--	87	32	83	1548	3194
ts-3237	3	49	37	187	701	2599

(Fortsetzung S.74)

Tab. 5 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.
 Pleiotroper Defekt von Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase und ATPase.
 Bzgl. Testmethoden und Anzuchsbedingungen s. Material und Methoden 13 und 15

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Dehydrogenase	NADH: Ubichinon Oxidoreduktase	ATPase Gesamt Oligomycin-empfindlich
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
ts- 374	--	21	39	81	2084	1511 690
ts-1394	30	11	6	91	1686	4020 3215
ts-2240	--	69	--	22	953	719 127
ts-2345	--	38	42	114	1917	1277 188
ts-2401	--	31	51	382	1492	1041 588
ts-2555	--	44	35	76	995	1795 930
ts-2609	--	54	20	40	604	1738 290
ts-2630	--	36	18	36	988	2181 1492
ts-2856	--	95	39	94	944	1881 1069
ts-3514	--	94	7	41	2238	4181 1741
ts-3762	--	65	22	73	1795	2440 962
ts-4201	--	51	38	163	2093	517 51
ts-4442	--	58	8	271	1060	953 127
ts-4908	37	13	51	100	944	4401 2510
ts-4980	--	74	8	48	1590	2800 1617
ts-5078	--	48	14		680	2639 1544

Tab.6 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphoryllierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Bzgl. Testmethoden und Anzuchsbedingungen s. Material und Methoden 13 und 15

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					Gesamt Oligomycin- empfindlich
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	
						ATPase
(a) Pleiotroper Defekt von Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Cyto- chrom c Oxidoreduktase/NADH-Q Oxidoreduktase und Succinat-Dehydrogenase.						
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
ts- 787	--	56	22	73	513	1428
ts-2977	--	98	63	130	596	1556
ts-3707	76	46	51	209	226	6244
(b) Defekt von NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase und Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase.						
ts-2022	239	96	73	218	883	2399

Tab. 7 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.
Vollständiger Ausfall aller Enzyme.
Bzgl. Testmethoden und Anzuchtbedingungen s. Material und Methoden 13 und 15

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxi- doreduktase	Succinat- Cytochrom c Oxi- doreduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxi- doreduktase	ATPase
						Gesamt Oligomycin- empfindlich
nmol min ⁻¹ mg ⁻¹						
ts- 286	--	17	11	31	61	2329 1455
ts- 349	--	14	--	13	66	1165 450
ts- 484	--	88	49	89	88	2386 1669
ts- 491	--	--	26	146	30	934 203
ts- 492	--	98	47	89	118	2704 1562
ts- 682	--	18	--	14	98	1392 995
ts- 822	--	--	--	206	132	2615 1441
ts-1200	--	24	89	160	574	209 40
ts-1242	--	11	--	16	320	313 156
ts-1541	--	41	33	44	361	3331 2268
ts-1601	--	70	35	219	221	4745 3752
ts-1922	--	71	8	35	164	1408 432
ts-2115	--	53	76	208	363	3215 2769
ts-2136	14	80	73	189	144	3564 2158
ts-2525	--	17	--	32	122	1568 829

(Fortsetzung S.78)

Tab. 8 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Heifemutanten.
Wildtyp-artige Muster.

Bzgl. Testmethoden und Anzuchtsbedingungen s. Material und Methoden 13 und 15

Hefestamm	spezifische Aktivitäten						
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	ATPase	
	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹						
ts- 221	123	583	276	483	2153	7215	5083
ts- 477	218	212	147	500	1354	6670	4890
ts- 657	150	200	196	628	1190	5120	3560
ts-2270	141	452	221	390	2166	4372	1802
ts-2901	101	182	121	479	1280	7688	5393
ts-3937	93	176	178	431	677	6932	5264
ts-4785	97	325	237	392	1880	6883	4900
ts-5055	167	425	241	409	1134	6082	4466

Eine typische Mutante von insgesamt 20 ist ts 4519.

- 5.) Pleiotroper Defekt von Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat Dehydrogenase/ATPase (Tab. 5). In dieser Gruppe findet man 16 Mutanten, ein Beispiel ist ts 2240.
- 6.) Pleiotroper Defekt von Cytochromoxidase/NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase/NADH-Q Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase (Tab.6a). Von diesem Typ wurden drei Mutanten charakterisiert (ts 3707, ts 2977, ts 787).
- 7.) Doppeldefekt von NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase und Succinat Cytochrom c Oxidoreduktase. Die einzige Mutante dieses Typs ist ts 2022. Sie ist eine der wenigen Mutanten mit erhalten gebliebener Cytochromoxidaseaktivität (s.Tab.6b).
- 8.) Spezifische ATPase Mutanten: Insgesamt 8 Mutanten diese Typs werden in Kapitel 4 näher beschrieben.
- 9.) Vollständiger Ausfall aller Enzyme: Es wurden 28 Vertreter dieses hochpleiotropen Phänotyps charakterisiert (Tab. 7).
- 10.) Kein Unterschied zum Wildtypmuster: Es wurden acht derartige Mutanten charakterisiert (Tab. 8).

Auffallenderweise findet man nur in den wenigsten Fällen spezifische Defekte einzelner Enzyme, sondern die meisten Mutanten weisen kombinierte Ausfälle mehrerer Enzymaktivitäten auf. Besonders häufig ist der gleichzeitige Ausfall aller Atmungskettenenzyme zu beobachten. Derartige Mutanten bilden mit 28 Vertretern immerhin die zweitgrößte Gruppe. Der Ausfall der Cytochromoxidase stellt mit 47

Vertretern den am häufigsten beobachteten Mutationsdefekt dar. Auch waren nahezu alle übrigen gefundenen Defekte mit einem Verlust der Cytochromoxidase-Aktivität gekoppelt. Diese Tatsache deutet auf eine besondere Empfindlichkeit dieses Enzyms gegen eine Störung des mitochondrialen Energiestoffwechsels hin. Eine andersartige Darstellung der geschilderten und in Tab. 1-8 enthaltenen Ergebnissen ist in Abb. 9 gezeigt. Hierbei sollten vor allem eventuelle Zusammenhänge beim Auftreten von Mehrfachdefekten deutlich werden. Die Zahlen geben die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Defektkombinationen an. Gezeigt ist jeweils schematisch die Atmungskette mit ihren charakteristischen Ausgangs- und Verzweigungspunkten. Diejenigen Wege des Elektronentransportes bzw. der ATP-Synthese, die durch die Wirkung der Mutation blockiert sind, wurden durch Verstärkung hervorgehoben.

4.) Suche nach spezifischen ATPase-Defekten bei pet-ts Mutanten

Beim Durchtesten der 183 Vertreter aus 180 Komplementationsgruppen war eine Gruppe von Mutanten charakterisiert worden, welche offensichtlich einen spezifischen ATPase-Defekt aufwies (vgl. Tab. 1-8). Wie bereits erwähnt, zeigte die Mutante ts 2789 (Komplementationsgruppe 38) einen ATPase-Defekt und relativ hohe Restaktivitäten der übrigen Enzyme. Die Mutanten ts 820 (Komplementationsgruppe 75) und ts 1305 (Komplementationsgruppe 104) zeigten ein ähnliches Aktivitätsmuster. Die Mutante 3760 (Komplementationsgruppe 209b) besaß als einzige Mutante die für eine spezifische ATPase-Mutante erwarteten Phänotyp deutlich ausgeprägt (Abb.10). Bedingt durch die allgemeine Messungenauigkeit (ca.20 %) der hier verwendeten Methodik (9) sind Messungen an einer Mutante nur unter gewissen Vorbehalten interpretierbar. Um das Aktivitätsmuster einer Mutante als Komplementationsgruppenspezifisch zu verifizieren, war es daher notwendig, die Enzym-Aktivitäten anderer Vertreter der gleichen Komplementationsgruppe zusätz-

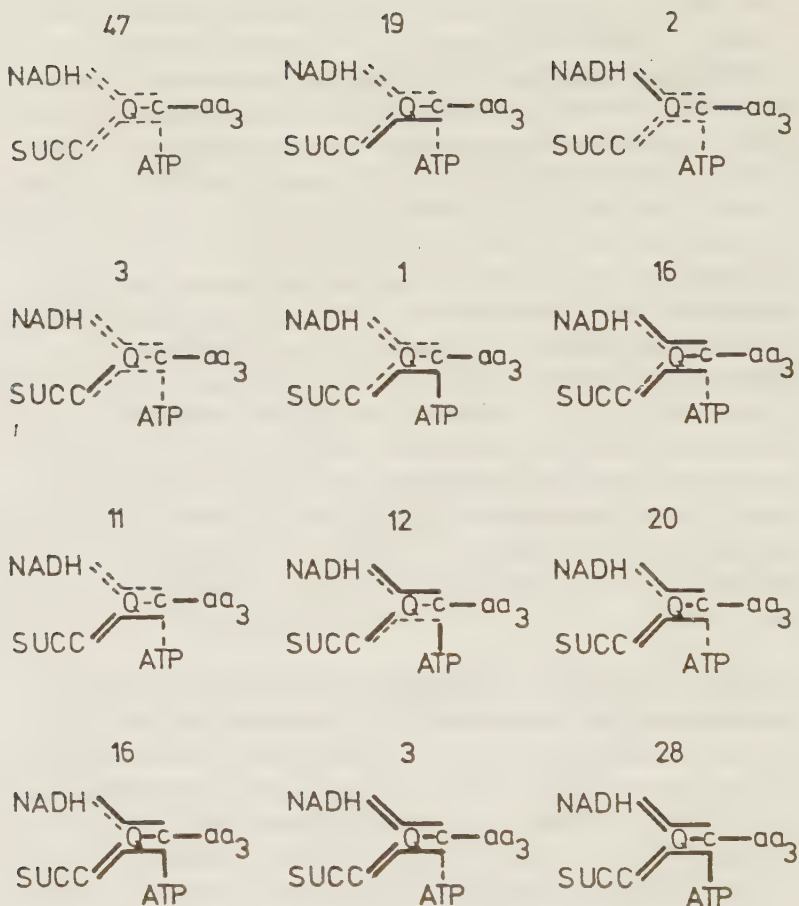


Abb. 9 Zusammenhänge bei Mehrfachdefekten in pet-ts Mutanten.

Dem Schema liegen die in Tabelle 1-8 dargestellten Ergebnisse zugrunde. Gezeigt ist jeweils die Atmungskette mit ihren Ausgangs- und Verzweigungspunkten: Succ = Succinat, Q = Ubichinon, c = Cytochrom c, aa₃ = Cytochromoxidase. Diejenigen Bereiche der Atmungskette, die durch eine Mutation blockiert wurden, sind durch eine durchgehende Linie hervorgehoben. Die Zahlen geben die Häufigkeiten des Auftretens der jeweiligen Defektkombination bei den untersuchten pet-ts Mutanten an.

lich zu messen. Erst die Gleichartigkeit des Phänotyps von verschiedenen Mutanten der gleichen Komplementationen-
gruppen erlaubt eine Aussage darüber, ob tatsächlich ein
spezifischer biochemisch genetisch interpretierbarer Defekt
vorliegt. Daher wurden von den aus Tabelle 1-8 als poten-
tiell ATPase-negativ charakterisierten Komplementations-
gruppen 38, 75, 104 und 209 b auch noch weitere Vertreter
auf ihre ATPase und Atmungsketten-Aktivitäten überprüft.
Die dabei erhaltenen Daten sind zum einen Teil (Gruppen
38 und 75) in Tabelle 1-8, zum anderen (Gruppen 104 und
209 b) in Tabelle 10 aufgeführt. Weiterhin sind alle je-
mals in dieser Arbeit als ATPase-defekt ($<20\%$ Wildtyp-
Aktivität) charakterisierten Mutanten bezüglich ihrer
verschiedenen mitochondriellen Enzymaktivitäten in Abb.
10 graphisch dargestellt.

Zum Zwecke der Auffindung von bisher unentdeckt geblie-
benen ATPase-Mutanten wurden außer den in Tabelle 1-8
aufgeführten und hinsichtlich aller Atmungskettenenzym-
aktivitäten untersuchten pet-ts Mutanten auch noch eine
größere Zahl zusätzlicher (diese stammen aus in der ersten
Testreihe noch nicht erfaßten Komplementationsgruppen)
willkürlich ausgesuchter Mutanten nur bezüglich ihrer
ATPase-Aktivität untersucht. Die Ergebnisse dieser Test-
reihe sind in Tabelle 9 enthalten. Die hierbei als ATPase
- negativ charakterisierten Mutanten sind in Tab. 10
besonders gekennzeichnet. Von allen Mutanten mit weniger
als 20% Wildtyp-ATPase-Aktivität wurden anschließend
auch noch alle übrigen Atmungsketten-Aktivitäten bestimmt.
Diese Daten wurden in Tab. 1-8 mit aufgenommen. Ein Ver-
gleich aller in dieser Arbeit als ATPase-negativ charak-
terisierten Mutanten (Abb.10) ergibt, daß lediglich die
Komplementationsgruppen 209 b und 104 spezifische ATPase-
Defekte repräsentieren. Alle übrigen Mutanten sind zumin-
dest auch noch negativ bezüglich der Cyto-chromoxidase-
Aktivität und im Extremfall bezüglich aller übrigen
Atmungskettenenzym-Aktivitäten. Die Cytochromoxidase ist
auch in Komplementationsgruppe 104 um durchschnittlich
 30% erniedrigt. Bei der Komplementationsgruppe 209 b



Abb. 10 Schematische, im Vergleich zum Wildtyp (= 100 %) normierte Darstellung der Atmungsketten-Enzymaktivitäten aller pet^s Mutanten mit weniger als 20 % Wildtyp-ATPase-Aktivität.

Bezüglich der Anzucht und Induktion der Mutanten vgl. Kapitel 3. Die Nummern der Komplementationgruppen stehen in Klammern. Die Aktivitäten der Enzyme Cytochromoxidase (a), NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase (b), Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase (c), NADH:Q Oxidoreduktase (d), Succinat-Dehydrogenase (e), Gesamt (f) und Oligomycin-sensitiver (g) ATPase wurden wie in Material und Methoden angegeben bestimmt und aufgetragen.

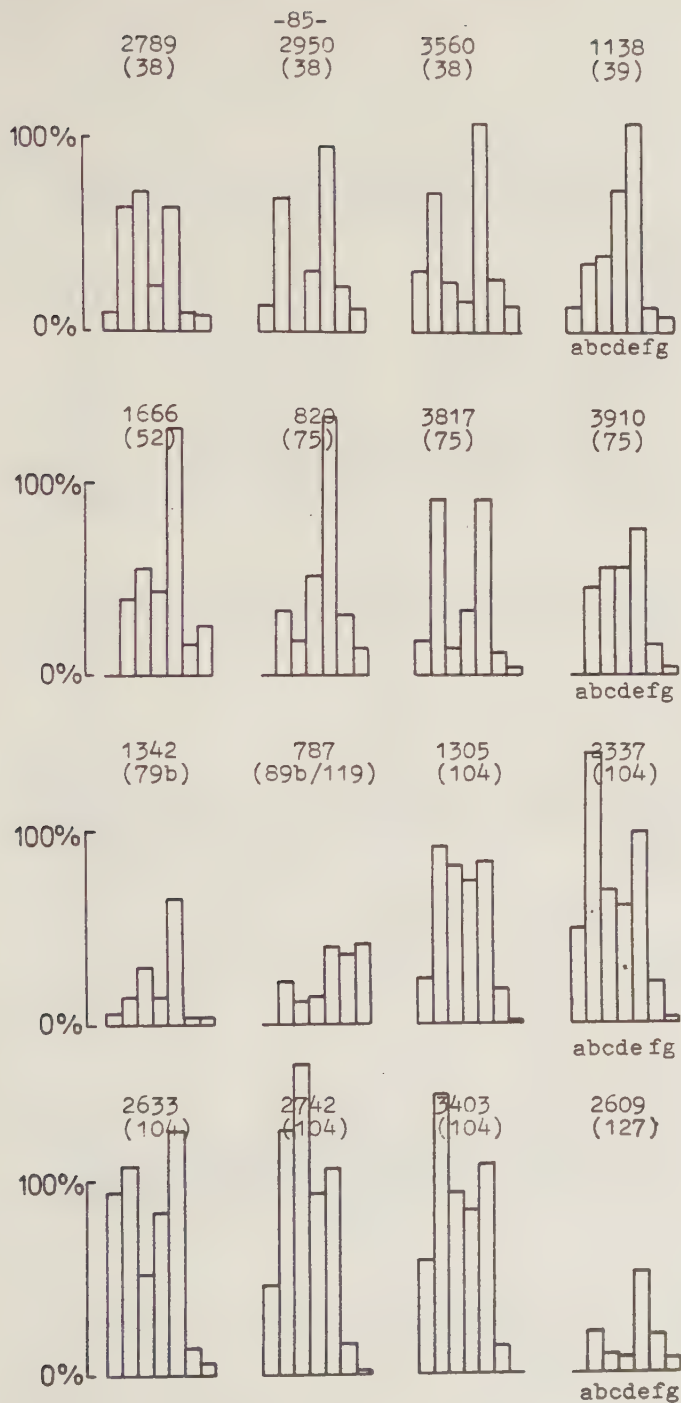


Abb. 10 (Fortsetzung)



Abb. 10 (Fortsetzung)



Abb. 10 (Fortsetzung)

Tab. 9 ATPase-Aktivitäten in den Mitochondrien Atmungsdefekter Hefemutanten.

Mutanten mit <20 % Wildtyp-Aktivität sind mit * gekennzeichnet.

Bezüglich Anzucht- und Testbedingungen vgl. Tab. 1.

pet-ts Mutante Nr.	ATPase-Aktivität	
	Gesamt	Oligomycinempfindlich
	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	
120	2184	1954
133	4297	1000
143	2324	1467
220	2590	1843
282	2942	1077
310	4320	3120
366	3699	1652
379	555	74*
410	2526	960
446	4573	1537
487	4352	2280
491	824	120*
575	3758	1118
576	4409	2269
600	61	10*
642	6380	5290
682	1392	995*
714	823	240*
752	4149	2337
785	4002	1505
787	504	52*
931	4538	1237
1037	5400	3023
1062	1831	348*

(Fortsetzung S.89)

Tab. 9 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	ATPase-Aktivität	
	Gesamt	Oligomycin- empfindlich
	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	
1075	6018	3242
1133	4372	1970
1138	889	180*
1186	3388	1654
1200	209	40*
1233	3233	1301
1285	2846	1068
1342	155	82*
1353	3271	1873
1374	5243	3715
1424	2995	1878
1454	5125	1748
1554	4987	2358
1642	5302	1610
1680	3522	1883
1715	673	294*
1753	2416	1010
1877	3524	1153
1922	1408	432*
1954	3794	1378
1976	2308	311*
2040	3425	1550
2061	3878	2049
2063	4132	1078
2104	2221	849
2281	3038	1495
2337	1502	150*
2352	388	0*
2385	3630	2493

(Fortsetzung S.90)

Tab. 9 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	ATPase-Aktivität	
	Gesamt	Oligomycin- empfindlich
	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	
2401	1041	588*
2406	3275	1730
2426	2644	1409
2498	2260	1199
2504	2993	1500
2515	9756	7756
2555	2747	1084
2596	2903	1280
2620	6771	4070
2633	993	331*
2639	2667	1373
2674	4027	1554
2680	2207	1007
2711	1039	195*
2742	1001	25*
2807	4891	2621
2838	6360	4080
2869	4025	2440
2950	1487	540*
2966	3897	1443
2998	2428	1192
3027	4802	2253
3200	2577	1858
3211	330	11*
3331	3303	1178
3386	3993	1712
3403	1069	0*
3411	3077	1469
3543	2591	1064
3560	2537	1091

(Fortsetzung S.91)

Tab. 9 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	ATPase-Aktivität	
	Gesamt	Oligomycin- empfindlich
	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	
3642	4919	2513
3724	724	71*
3804	847	151*
3817	724	145*
3832	370	150*
3854	3544	2037
3878	3847	1903
3910	1114	171*
4005	4915	1487
4023	2255	1737
4024	2459	1134
4030	5190	3025
4084	1779	1103
4090	2559	1056
4201	517	51*
4206	2272	1207
4243	8783	2936
4271	1001	120*
4354	938	529*
4442	827	301*
4519	6029	4158
4689	1215	319
4753	3071	1217
4937	5739	2437
4980	5107	3673
5040	3079	1401
5046	2180	1527
5061	750	348*
5078	4314	2009

Tab. 10 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.
Mutanten der Komplementationsgruppen 104 und 209b.

Bzgl. Testmethoden und Anzuchsbedingungen s. Material und Methoden 13 und 15

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Dehydrogenase	NADH: Ubichinon Oxidoreduktase	ATPase Gesamt Oligomycin-empfindlich
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
SC 167	164	244	193	585	1294	4560
ts-1305 (104)	44	225	216	424	1085	105
ts-2337 (104)	98	345	173	356	1287	150
ts-2633 (104)	156	265	120	487	1628	331
ts-2742 (104)	77	313	357	532	1384	25
ts- 714(209b)	102	146	28	501	1300	237
ts-3760(209b)	251	400	273	440	1459	0
ts-3804(209b)	112	211	144	483	1742	151

findet sich eine, im arithmetischen Mittel um 15 % reduzierte Cytochromoxidase Aktivität. Alle anderen Mutanten der Abb. 10 zeigen, wie erwähnt, Mehrfachdefekte und kommen daher als spezifische ATPase-Mutanten nicht in Frage.

B. Immunologische Untersuchungen an pet-ts Mutanten mit ATPase Antiserum:

Die bei Atmungsketten-Mutanten häufig gefundenen kombinierten Ausfälle mehrerer Enzyme können verschiedene Ursachen haben. Einmal können diese eine mittelbare Folge der Mutation - etwa auf Grund des veränderten Energiezustandes der Zelle bzw. der Mitochondrien oder - als Folge von veränderten Protein - Wechselwirkungen zwischen den Komplexen oder ihren Komponenten - auftreten oder aber bestimmte Mutationen könnten auch direkt einen koordinierten Ausfall der Synthese mehrerer Untereinheiten einer oder mehrerer Atmungskettenenzyme bewirken. Auf Proteinebene lassen sich daraus resultierende Veränderungen mit Hilfe von spezifischen Antisera gegen bestimmte Atmungskettenenzyme untersuchen. An diesem Institut wurden immunologische Untersuchungen an drei Enzymkomplexen der Atmungskette durchgeführt: dem bc_1 -Komplex (18), der Cytochromoxidase (39) und in dieser Arbeit, an der mt-ATPase.

Als Voraussetzung für derartige Versuche mußte zunächst der ATPase Komplex gereinigt und ein spezifisches Antiserum dagegen hergestellt werden.

1.) Reinigung der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Bäckerhefe.

Die direkte Nacharbeitung der von Ryrie beschriebenen Anleitung zur Isolierung der oligomycinsensitiven ATPase (15) erwies sich zunächst als schwierig. Zuerst wurde der maschinelle Aufschluß der Bäckerhefe mit dem Braun-Homogenisator durch den wesentlich schonenderen Aufschluß der manuellen Schüttel-Methode nach Lang et al (13) ersetzt. Diese Aufschlußart lieferte intakte Mitochondrien, die sich gut und rasch bei 17.000 xg abzentrifugieren ließen. Zur Lyse der erhaltenen Mitochondrien wurden zwei Arten von Detergentien benutzt: Das von Ryrie vorgeschlagene Gemisch aus 0,1 % Triton und 0,5 % Na-Cholat oder das

von Hjemeland erwähnte CHAPS, das ist 3-((3-cholamido-propyl)-dimenthylammonio)-1-propansulfonat (14). Nach Lyse mit CHAPS traten bei der Elektrophorese des isolierten Enzyms die Untereinheiten 4,5 und 6 deutlich in Erscheinung (vgl. Abb. 12). Im Gegensatz zu der von Ryrie beschriebenen Isolationsmethode wurde von uns vor dem Saccharosegradienten noch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung vorgenommen. Die Fraktionen zwischen 35 % und 55 % Sättigung erwies sich dabei als günstig zur Weiterverarbeitung. Bei diesem Schritt gehen zwar 85 % der Gesamtaktivität verloren, die spezifische Aktivität steigt jedoch um den Faktor 3.5 (vgl. Tab. 11). Nach dieser Ammoniumsulfatfällung war das Probenvolumen von vorher 60-70 ml auf 2-5 ml reduziert und konnte in dieser Form leicht auf einen Saccharosegradienten aufgetragen werden. Abb. 11 zeigt das Sedimentationsprofil der ATPase-Aktivität nach 15-stündiger Zentrifugation. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt. Auf die bei Ryrie beschriebenen nachfolgende Sepharose 4 B-Chromatographie wurde verzichtet, da in Vorversuchen dabei keine weiteren Reinigungseffekte festgestellt wurden. Abb. 12 zeigt die letztlich erhaltene ATPase-Präparation nach Elektrophorese in einem 15-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengel. Die Untereinheiten wurden nach der von Douglas beschriebenen Nomenklatur beziffert.(32)

2.) Herstellung und Überprüfung eines spezifischen Antiserums gegen den gereinigten ATPase Gesamtkomplex der Hefe.

Das spezifische ATPase-Antiserum wurde, wie in Material und Methoden im einzelnen beschrieben, gegen SDS-denaturiertes Gesamtenzym hergestellt. Der Ouchterlony-Immunitätsdiffusionstest zeigte mit dem so gewonnenen Serum Präzipitationslinien bis zu einem Titer von 1:8.

Eine Überprüfung von Reinheit und Spezifität des Antiserums wurde mittels "Western-Blot" Analyse unternommen. Zur Bestimmung der ATPase-Untereinheiten wurde auf dem

Tab. 11 Anreicherungschema der ATPase-Isolierung.

Werte in Klammern sind ATPase-Aktivitäten nach Oligomycinzugabe. Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

a= Werte aus der Literatur.

	Gesamtaktivität		Protein		spez. Aktivität		Protein ^a		spez. Aktivität ^a	
	$\mu\text{g min}^{-1}$		mg		$\mu\text{g min}^{-1}\text{mg}^{-1}$		mg		$\mu\text{g min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	
Mitochondrien	4000		1000		4,0		234		13,3	
1 ^h 100000 xg	1579		378		4,2					
Ammoniumsulfat-fällung	235		16,2		14,5					
Saccharosegradient	179 (128)		4,4		40,7 (29,1)		9,1		38,8 (22,7)	
Sepharosesäule							5,1		43,7 (27,9)	

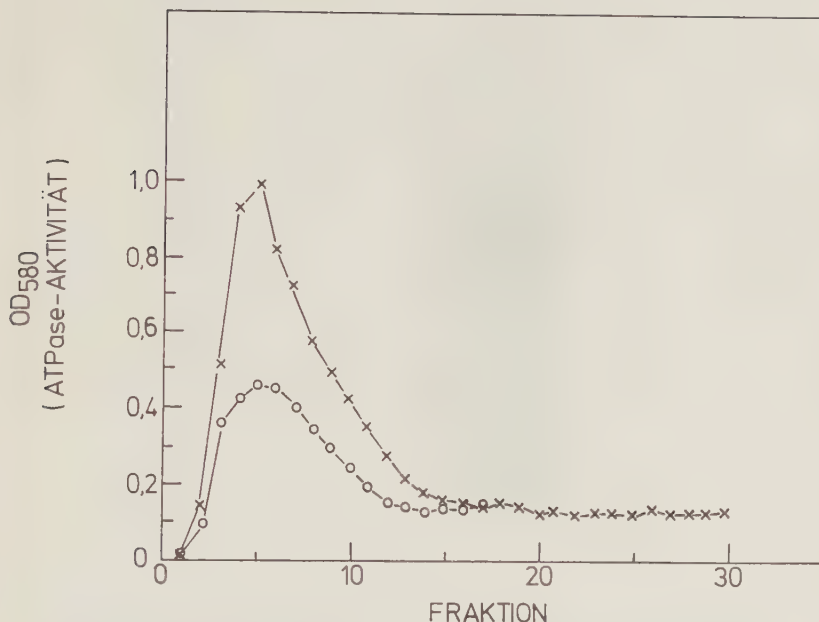


Abb. 11 Aktivitätsprofil der Oligomycin-sensitiven ATPase im Saccharosegradienten

Das Enzym (1-1,5 ml pro Röhrchen, entspr. 2,5 mg Protein) wurde in einem 10% - 30% Saccharosegradienten für 15,5 Stunden im Beckman-Vertikalrotor (TV 8 50) bei 85.000 xg, 4°C, zentrifugiert. Nach dem Austropfen des Gradienten wurde in jeder Fraktion die gesamte (x) und die Oligomycin-sensitive (o) ATPase-Aktivität bestimmt. Bezüglich des ATPase-Tests siehe Material- und Methoden.

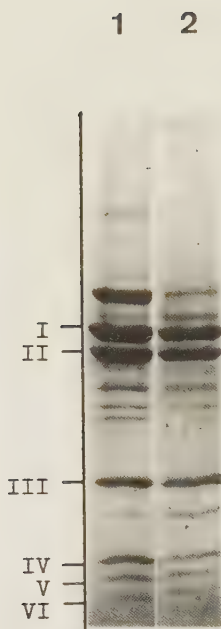


Abb. 12 SDS-Gelelektrophorese der isolierten Gesamt-ATPase

Es wurden 100 Mikrogramm gereinigtes Enzym in einem 15% - 20% SDS-Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Die Bahnen 1 und 2 geben zwei verschiedene Enzympräparationen dieser Arbeit wieder. Römische Zahlen bezeichnen die bekannten ATPase-Untereinheiten (31).

gleichen Gel gereinigter bc_1 -Komplex als Molekulargewichts Standard mit aufgetragen. Nach Transfer auf Nitrozellulose wurde der bc_1 -Komplex zur radioimmunologischen Sichtbarmachung mit bc_1 -Antikörpern inkubiert. Anhand einer damit aufgestellten Eichgerade (Abb.14) und auf Grund der bekannten Molekulargewichte der ATPase-Untereinheiten (31) konnten nun die verschiedenen Banden des Gelbildes (Abb.13) den einzelnen ATPase-Untereinheiten zugeordnet werden (Abb.13). Im Gegensatz zu den mit Coomassie Blau gefärbten Gelen konnte mit der empfindlicheren radioimmunologischen "Western-Blot" Methode auch Untereinheit VII und, bei Hybridisierung gegen das SC 167-Rohserum, auch Untereinheit VIII sichtbar gemacht werden. Die mitochondriell kodierte Untereinheit VI war auf dem mit Coomassie Blau gefärbtem Gel wesentlich besser zu sehen als beim immunologischen Nachweis. Möglicherweise war diese Untereinheit auf Grund ihrer (zentralen?) Position im nativen Komplex weniger immunogen.

Da es wahrscheinlich war, daß der isolierte ATPase-Gesamtkomplex in gewissem Umfang mit unspezifischen Proteinen verunreinigt war, sollte zum Vergleich auch die Kreuzreaktion von Cytochromoxidase- und bc_1 -Antiserum gegen gereinigte Gesamt-ATPase untersucht werden. Das Resultat dieser Versuche ist in Abb. 15 dargestellt. Im Vergleich zum homologen System treten in beiden Fällen nur andeutungsweise heterologe Kreuzreaktionen auf.

3.) Optimierung der "Western-Blot"-Technik zur systematischen Untersuchung einer größeren Zahl verschiedener pet-ts Mutanten.

Die in der Literatur beschriebene "Western-Blot"-Technik (20) konnte nicht unverändert auf die Problematik dieser Arbeit übertragen werden. Beim Transfer spielten offenbar verschiedene Parameter wie Gelzusammensetzung und die Größe der zu transferierenden Untereinheiten eine ausschlaggebende Rolle. Daher wurden Vorversuche zur Bestimmung der optimalen Transferdauer und der not-

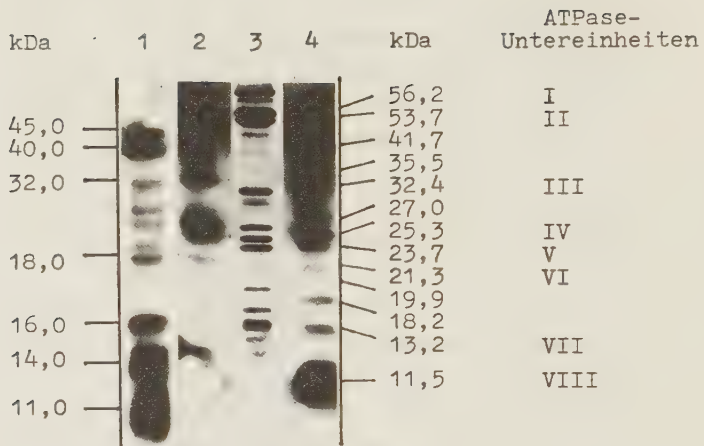


Abb. 13 Bestimmung des Molekulargewichts der ATPase-Untereinheiten mit Hilfe des bc_1 -Komplexes als Eichprotein

Gereinigter bc_1 -Komplex (Bahn 1), gereinigte ATPase (Bahn 2) und Sc 167 -Rohextrakt (Bahn 4) wurden im gleichen Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Gereinigte ATPase und Sc 167-Rohextrakt wurden mit spezifischen ATPase-Antiserum, gereinigter bc_1 -Komplex mit spezifischem bc_1 -Antiserum inkubiert. Aus den Laufstrecken und den bekannten Molekulargewichten der Untereinheiten des bc_1 -Komplexes wurde eine Eichkurve erstellt (Abb. 14). Die Molekulargewichte der ATPase-Komponenten wurden daraus ermittelt. Die ATPase-Untereinheiten sind in römischen Zahlen angegeben. Bahn 3 gibt ein von Ryrie (47) veröffentlichtes ATPase-Bandenmuster (im gleichen Gelsystem) wieder.

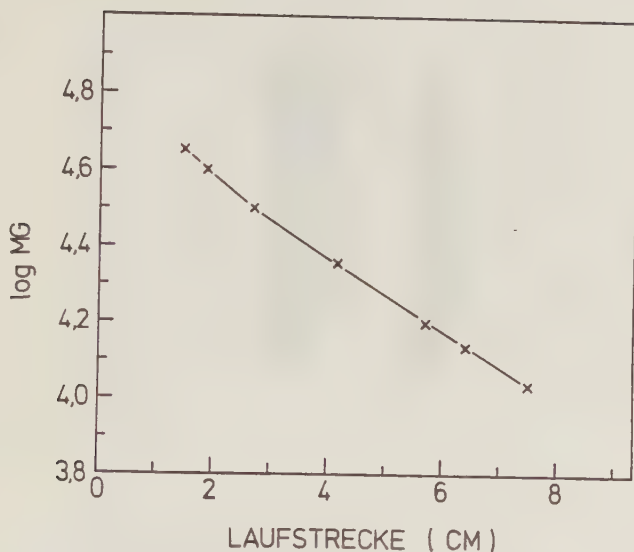


Abb. 14 Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung der ATPase-Untereinheiten

Die Eichkurve wurde aus den bekannten Molekulargewichten der Untereinheiten des bc_1 -Komplexes (18) gewonnen. Zur Versuchsdurchführung vgl. Abb. 13.

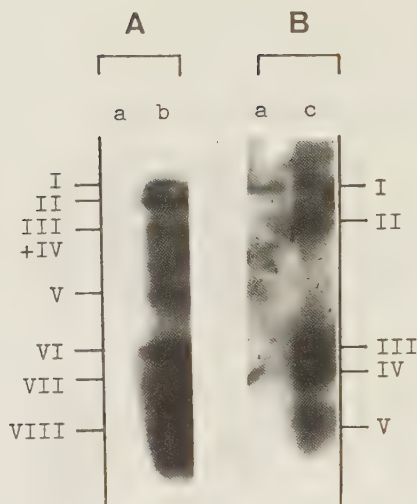


Abb. 15 Kreuzreaktion von Cytochromoxidase- und bc_1 -Antiseren mit gereinigter ATPase

Gereinigte ATPase (Bahnen a), bc_1 -Komplex (Bahn b) und Cytochromoxidase (Bahn c) wurden aus einem gemeinsamen Gel auf Nitrozellulose transferiert. Die Bahnen a und b in Gel A wurden mit spezifischem bc_1 -Antiserum, die Bahnen a und c in Gel B mit spezifischem Cytochromoxidase-Antiserum inkubiert. Die römischen Zahlen bezeichnen die verschiedenen Unter-einheiten von bc_1 -Komplex und Cytochromoxidase.

wendigen Stärke des elektrischen Feldes durchgeführt. Als brauchbar erwies sich schließlich eine Transferdauer von 60 Minuten bei 250 mA Anfangsstromstärke (s. Material und Methoden). Durch Auflage eines zweiten Nitrozellulosefilters konnte nachgewiesen werden, daß bei einem Transfer unter den obigen Bedingungen keine Proteine durch die Nitrozellulose-Membran hindurch passierten. Beim Beladen des Gels war es notwendig, gleiche Volumina und Proteinmengen aufzutragen. Gute Erfahrungen wurden mit 10-20 Mikrogramm gereinigtem Enzym oder, beim Durchtesten der Mutanten, mit 200 - 300 Mikrogramm Rohextrakt pro Geltasche gemacht. Weiterhin war es wichtig, bei der nachfolgenden Inkubation mit Antikörpern nicht zu verdünntes Serum (ca. 200 Mikrogramm/Mikroliter) zu nehmen. Zugabe von größeren Mengen Antiserum brachte keine Verbesserung. Die in Plastikfolien eingeschweißten Nitrozellulosefilter wurden sowohl bei der Inkubation mit Antiserum als auch nach der Zugabe von radioaktivem Protein A ständig geschüttelt. Das gewährleistete eine gleichmäßige Reaktion mit der gesamten Filteroberfläche.

Die in der Literatur angegebenen Werte von 1×10^6 Cpm radioaktiv markiertem Protein A erwies sich als nicht ausreichend. Es wurde durchweg mit 8×10^6 Cpm pro Filter gearbeitet. Höhere Protein-A-Mengen brachten keine Verbesserung der Radioimmun-Bilder.

4.) Radioimmunologische Untersuchungen von 149 pet-ts Mutanten aus 134 verschiedenen Komplementationsgruppen.

Eine Dokumentation aller in dieser Arbeit durchgeführten "Western-Blot" Analysen im Kontext der jeweiligen Gele befindet sich im Anhang (Abb. 28). Eine schematische Darstellung der dabei beobachteten ATPase-Untereinheitenmuster, geordnet entsprechend ihrer Gleich- bzw. Verschiedenartigkeit, findet man in Abb. 25. Man sieht,

daß unter den bearbeiteten Mutanten ein breites Spektrum von Abweichungen der ATPase-Untereinheitenzusammensetzung im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten ist. Diese Abweichungen reichen vom spezifischen Ausfall etwa der Untereinheit IV über den kombinierten Defekt mehrerer Untereinheiten bis zum Ausfall nahezu des gesamten Enzymkomplexes. Interessant ist auch das gelegentliche Auftreten neuartiger Banden zusätzlich oder an Stelle einer der üblichen Komponenten. Im folgenden wird eine systematische Beschreibung der durchgetesteten pet-ts Mutanten unter dem Gesichtspunkt mutationsbedingter Besonderheiten durchgeführt.

Ein Vergleich der in Abb. 16 einander gegenübergestellten Bandenmustern von Wildtyp-Extrakten aus verschiedenen "Western-Blot" Analysen erlaubt eine Abschätzung der Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der verwendeten Testmethode. Deutlich zu erkennen ist, daß zwar im Gelbereich zwischen den Untereinheiten V und VIII die relativ Intensitäten homologer Banden gelegentlich schwanken, daß aber ansonsten eine recht zufriedenstellende Übereinstimmung und demnach methodische Reproduzierbarkeit gegeben ist.

a.) Wildtypartige Muster:

Der größte Teil der durchgetesteten Mutanten (59 %) zeigte ein grundsätzlich Wildtyp-artiges ATPase Muster. Einige Vertreter dieser Mutantengruppe sind in Abb.17 gezeigt. Diese Mutanten besitzen offenbar Defekte, die sich nicht auf die Proteinstruktur des ATPase-Komplexes auswirken. Biochemische Aktivitätsbestimmungen lassen nichtsdestoweniger in manchen Fällen einen deutlichen Funktionsverlust erkennen (siehe 4i).

Ein genauer Vergleich der Wildtypartigen Muster macht deutlich, daß zwar eine Reihe von Intensitätsunterschieden zwischen homologen Banden in den verschiedenen Mutantenstämmen zu erkennen sind,

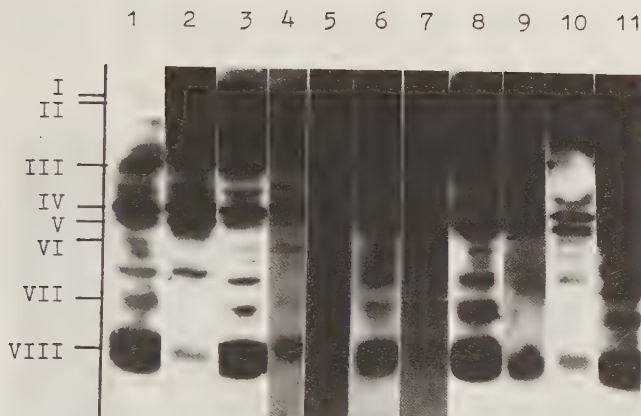


Abb. 16 "Western-Blot" - Analysen einiger Wildtyp-Zellrohextrakte zusammengestellt aus verschiedenen Originalgelbildern.

(Bahn 1) Gelbild 11, (Bahn 2) Gelbild 2, (Bahn 3) Gelbild 15, (Bahn 4) Gelbild 1, (Bahn 5) Gelbild 7, (Bahn 6) Gelbild 10, (Bahn 7) Gelbild 6, (Bahn 8) Gelbild 13, (Bahn 9) Gelbild 16, (Bahn 10) Gelbild 3, (Bahn 11) Gelbild 9. Die entsprechenden Originalgelbilder sind in Abb. 28 zu sehen.

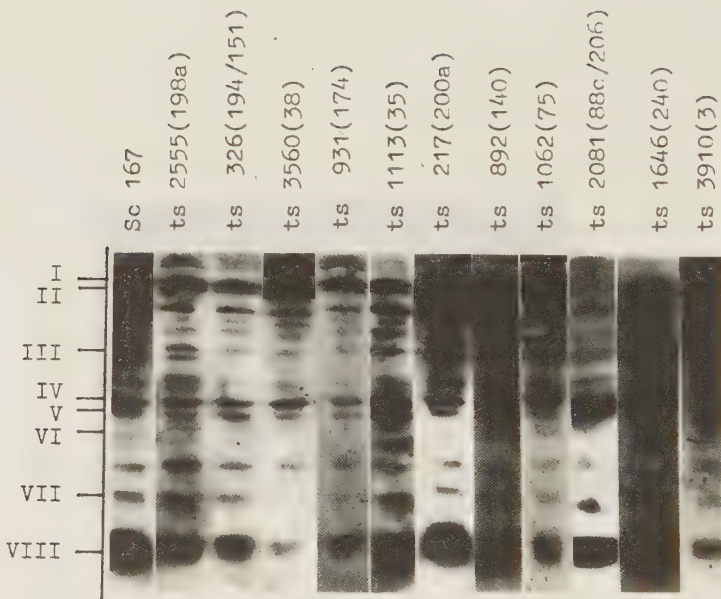


Abb. 17 "Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten aus-
gesuchter pet-ts Mutanten mit Wildtyp-artiger
ATPase-Proteinstruktur.

Die Original-Gelbilder der gezeigten Mutanten sind in Abb. 28 Bild 1 (ts 3910), Bild 4 (ts 2555, ts 326, ts 3560, ts 931, ts 1113), Bild 12 (ts 1646), Bild 14 (ts 217), Bild 19 (ts 2081), Bild 20 (ts 892) und Bild 22 (ts 1062) zu sehen. Hinter der Mutanten-Nr. befindet sich in Klammern die Nummer der entsprechenden Komplementationsgruppen.

diese Unterschiede können jedoch auch technisch bedingt und daher nur scheinbar sein. Aus diesem Grund sollen sie hier nicht im einzelnen diskutiert werden.

b.) Untereinheiten I und II:

Die ATPase-Untereinheiten I und II waren in allen untersuchten Mutanten deutlich nachweisbar. Ein Hinweis auf einen spezifischen Defekt einer dieser beiden Untereinheiten bei sonst normalen Bandenmuster wurde nie beobachtet. Zusammen mit dem Fehlen aller anderen Untereinheiten waren diese Banden in ts 1374, ts 3077 und ts 2100 (s. Abb. 23) sehr schwach ausgeprägt. Die in manchen Gelbildern direkt über der Untereinheit I auftretenden zwei bis drei Banden können vielleicht mit den auch von anderen Autoren (34) erwähnten Vorstufen der Untereinheiten I oder II identisch sein. Diese Vorstufen haben eine Größe von 64 bzw. 56 kDa. Auch bei den in (4a) zusammengestellten Wildtyp-Mustern sind diese Banden nur teilweise vorhanden. Das Fehlen dieser Banden in einigen Mutanten muß also nicht unbedingt eine mutationsbedingte Veränderung sein.

c.) Untereinheit III:

Es konnten keine Mutanten mit einem spezifischen Ausfall der Untereinheit III gefunden werden. Bei einigen Mutanten allerdings, die ein auch in den übrigen Untereinheiten stark vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster aufweisen (z.B. ts 313, ts 1737 oder ts 1558, s. Abb. 18) war eine leichte Verschiebung, Verstärkung oder gar Verdoppelung dieser Bande zu beobachten.

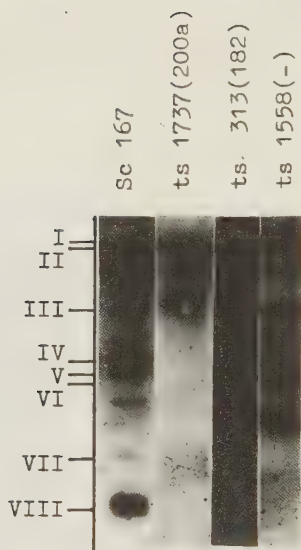


Abb. 18 "Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten
ausgesuchter pet-ts Mutanten, die sich be-
züglich Untereinheit III der ATPase vom
Wildtyp-Enzymmuster unterscheiden.

Die Original-Gelbilder der gezeigten Mutanten sind in Abb. 28 Bild 8 (ts 313), Bild 16 (ts 1558) und Bild 22 (ts 1737) zu sehen. Komplementationsgruppennummern stehen in Klammern. Die Komplementationsgruppe der Mutante ts 1558 ist unbekannt.

d.) Untereinheiten IV und V:

Bei 2 Mutanten (ts 1922 und ts 4243) konnte ein spezifischer Ausfall der Untereinheit IV nachgewiesen werden (s. Abb. 19). Die Intensität aller anderen Banden ist in beiden Mutanten normal. Eine zusätzliche Bande mit etwas höherem Molekulargewicht (ca. 27 kDa) trat in beiden Mutanten vergleichsweise stärker hervor, obwohl sich auch in anderen Zellextrakten erkennbar war. Ob es sich hier um eine nicht prozessierte Vorstufe von Untereinheit IV handelt, müsste überprüft werden.

Ein spezifischer Defekt von Untereinheit V wurde nicht gefunden. Diesbezügliche Ausfälle waren stets mit einem Abbau von 1-3 weiteren Untereinheiten (z.B. V, VI, VII oder VIII) gekoppelt.

e.) Untereinheiten VI, VII und VIII:

Da die Untereinheiten VI und VII in dem hier verwendeten System praktisch nicht sichtbar gemacht werden konnten, kann hier über diesbezügliche Ausfälle auch nichts gesagt werden. Im übrigen ist Untereinheit VI auch mt DNA-kodiert und interessiert im vorliegenden Zusammenhang daher weniger. Dem gegenüber wurde eine Anzahl von Mutanten gefunden, bei denen die Untereinheit VIII fehlte. Abb. 20 zeigt einige Beispiele dazu.

f.) Verschobene und oder zusätzliche Banden:

Bei der Beurteilung einer bei einigen Mutanten zu beobachtenden Positionsverschiebung bestimmter Banden im Vergleich zum Wildtyp liegt in den meisten Fällen der Verdacht nahe, daß artifizielle, d.h. technische Effekte die Ursache hierfür sein dürfen (z.B. bei ts 630, Abb. 28, Bild 19).

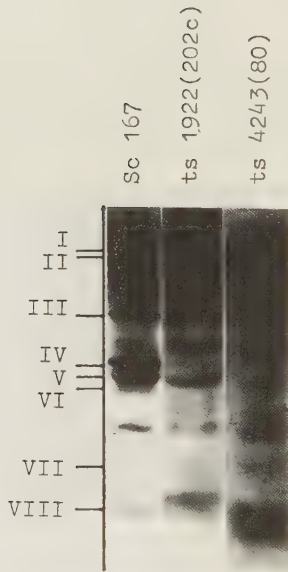


Abb. 19 "Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten
ausgesuchter pet-ts Mutanten, die sich be-
züglich Untereinheit IV der ATPase vom Wild-
typ-Enzymmuster unterscheiden.

Die Original-Gelbilder der gezeigten Mutanten sind in
Abb. 28 Bild 10 (ts 1922) und Bild 18 (ts 4243) zu
sehen.

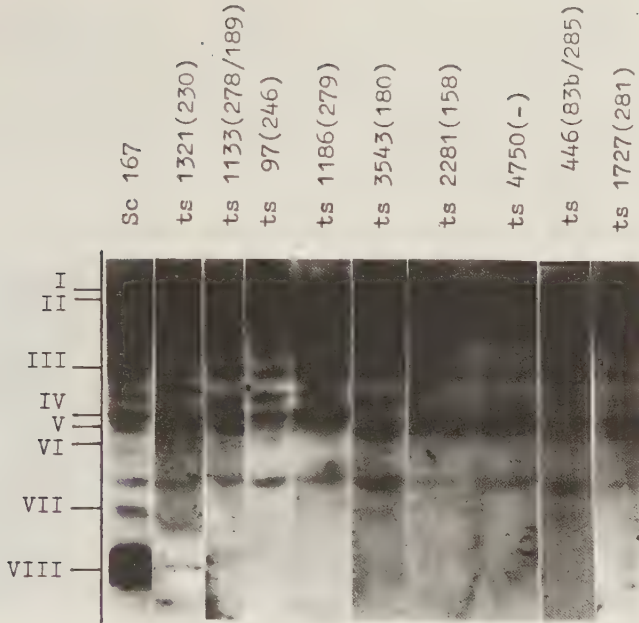


Abb. 20 "Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten
ausgesuchter pet-ts Mutanten, die sich in
der Untereinheit VIII der ATPase vom Enzym-
muster des Wildtypstammes unterscheiden.

Die Original-Gelbilder der gezeigten Mutanten sind
in Abb. 28 Bild 1 (ts 1727), Bild 10 (ts 97, ts 1186),
Bild 15 (ts 1321), Bild 16 (ts 1133), Bild 17 (ts 446),
Bild 18 (ts 3543) und Bild 20 (ts 2281, ts 4750) zu
sehen. Komplementationsgruppen-Nummern stehen in Klammern.

Demgegenüber steht das Vorliegen drastisch abweichender Gelpositionen mehrerer ATPase-Komponenten in einigen anderen pet-Mutanten außer Frage. Wie aus Abb. 21 hervorgeht, weisen alle diesbezüglichen Mutanten untereinander deutliche Ähnlichkeiten auf. Nichtsdestoweniger lassen sich diese stark abweichenden Mutanten 2 verschiedenen Gruppen zuordnen, A und B in Abb. 21. In den Mutanten der ersten Gruppe (A) fehlen die Untereinheiten IV, V und VIII und die Untereinheiten I und II sind nur schwach erkennbar, während mehrere neue, starke Banden im Bereich zwischen den Untereinheiten II und IV bzw. V und VIII auftreten. Demgegenüber sind in ts 1737 (V in Abb. 21) die Untereinheiten I und II vorhanden und die neuen Komponenten treten im Gel nur im Bereich zwischen Untereinheit II und IV auf. In einer dritten Gruppe von Mutanten schließlich (C in Abb. 21) tritt eine auffällige Verstärkung der im Wildtyp nur schwach vorhandenen 19,9 kDa Bande auf (Pfeil). Interessanterweise handelt es sich hier in 2 Fällen (ts 3804 und ts 1305 um Mutanten, die im Biochemischen Test als ATPase-negativ erkannt waren (s. nächster Abschnitt).

g.) ATPase-defekte pet-Mutanten:

In Abb. 22 sind die Autoradiogramme der ATPase-Mutanten aus den Komplementationsgruppen 104 (ts 2633, ts 2742, ts 2337, ts 1305, ts 3403) und 209b (ts 714, ts 3804, ts 3760) dargestellt. Die Mutanten der Komplementationsgruppen 104 und 209b zeigen - abgesehen von der oben bereits erwähnten Intensitätsverstärkung in ts 3804 und ts 1305 - alle ein Wildtyp-artiges Bandenmuster im SDS-Gel.

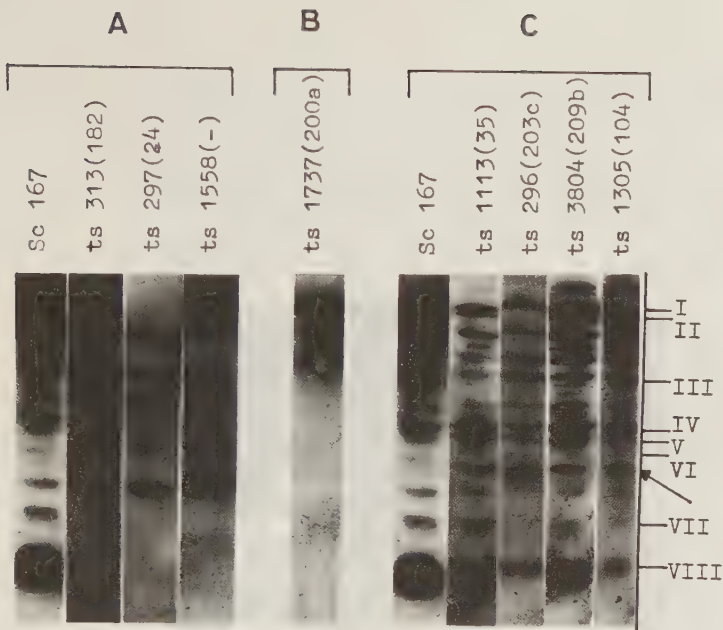


Abb. 21 "Western-blot"-Analyse von Zellextrakten
ausgesuchter pet-ts Mutanten, die sich be-
züglich des ATPase-Bandenmusters stark vom
Wildtyp-Bandenmuster unterscheiden (A,B),
bzw. Intensitätsverstärkung der 19,9 kDa-
Bande zeigen (C).

Die Original-Gelbilder der gezeigten Mutanten sind in Abb. 28 Bild 1 (ts 1305), Bild 2 (ts 3804), Bild 4 (ts 1113), Bild 8 (ts 313, ts 296), Bild 13 (ts 297), Bild 16 (ts 1558) und Bild 22 (ts 1737) zu sehen.

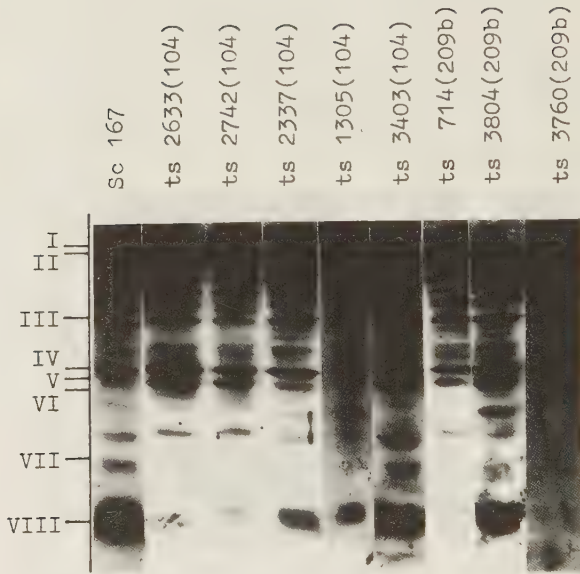


Abb. 22 "Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten
ausgesuchter pet-ts Mutanten der ATPase-ne-
gativen Komplementationsgruppen 104 und 209b.

Die Original-Gelbilder der gezeigten Mutanten sind in
Abb. 28 Bild 1 (ts 1305, ts 3760), Bild 2 (ts 2633,
ts 2742, ts 3804), Bild 3 (ts 2337, ts 714) und Bild
15 (ts 3403) zu sehen.

h.) Vollständiger Ausfall des ganzen ATPase-Komplexes:

Bei einigen Mutanten scheint der Mutationseffekt derart gravierend zu sein, daß er unter nicht permissiven Bedingungen zu dem nahezu vollständigem Fehlen aller ATPase-Untereinheiten im Zellextrakt führt (vgl. Abb.23).

Bei genauer Betrachtung der schematischen Zusammenstellung aller durchgetesteten Mutanten (Abb.25) erkennt man einen nahezu stufenlosen Übergang von den Mutanten mit Wildtyp-artiger Enzymzusammensetzung über eine mengenmäßig gleichförmige Abnahme aller Komponenten bis hin zum nahezu vollständigen Abbau des gesamten Komplexes. So ist z.B. bei der Mutante ts 1113 das komplette Enzymmuster noch vorhanden, bei den Mutanten ts 3332 wird das Fehlen der kleinen Untereinheiten VI, VII, VIII beobachtet, bei ts 1737 ist ab Untereinheit III alles abgebaut, bis schließlich bei ts 3077 nur noch die Untereinheiten I und II schwach nachweisbar sind.

In allen Mutanten mit praktisch vollständig abgebautem ATPase-Komplex konnte gezeigt werden, daß die Defizienz Teil einer weitergehenden, auch andere Komponenten der Atmungskette (wie bc_1 -Komplex und Cytochromoxidase) betreffenden Pleiotropie war (18, 30). Ein genauer Vergleich der "Western-Blot" Analysen mit verschiedenen Antiseren befindet sich in Kapitel 5.

i.) Vergleich der "Western-Blot" Analysen mit den enzymatischen ATPase-Aktivitätsbestimmungen:

Für 87 Mutanten lagen sowohl "Western-Blot" Analysen als auch enzymatische Messungen des ATPase-Komplexes vor. Diese Daten erlaubten einen Vergleich der prozentualen ATPase-Aktivität mit der Struktur

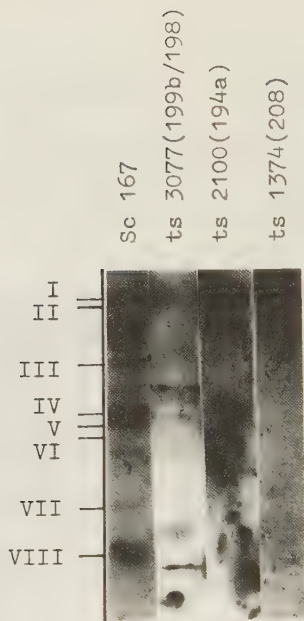


Abb. 23 "Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten
ausgesuchter pet-ts Mutanten mit nahezu
vollständigem Ausfall des ATPase-Komplexes.

Die Original-Gelbilder der gezeigten Mutanten sind
in Abb. 28 Bild 15 (ts 3077), Bild 16 (ts 2100) und
Bild 18 (ts 1374) zu sehen.

des Komplexes auf Proteinebene. Aus Tabelle 12 wird ersichtlich, daß mit 2 Ausnahmen (ts 4246, ts 313) bei Stämmen mit ATPase-Aktivität $< 70 \%$ der Wildtyp-Aktivität eine wildtypartige Proteinstruktur des Enzyms vorlag.

Ein wildtypartiges Bandenmuster weisen auch viele Mutanten (ca 50 %) mit einer ATPase-Aktivität $< 70 \%$ Wildtyp-Aktivität auf. Das bedeutet, daß bei diesem Enzym ähnlich wie bei anderen Proteinen, eine mutationsbedingte Inaktivierung nur mit drastischen Veränderungen der physikalischen Proteinstruktur einhergehen.

Erstaunlicher dagegen ist, daß bei einigen proteinchemisch stark aberranten Mutanten (z.B. ts 313 und ts 4246) immer noch mehr als 70 % Wildtyp-Aktivität vorhanden war. Es muß offen bleiben, ob es sich hier evtl. um Meßfehler oder Reversions-Effekte handelt.

k.) Vergleich der ATPase-Untereinheitenmuster verschiedener Mutanten aus gleichen Komplementationsgruppen:

Soweit vorhanden, wurden in Abb. 24 die Gelbilder verschiedener Vertreter der Komplementationsgruppen 4, 22, 38, 46, 75, 102, 143, 192, 194 a/151 miteinander verglichen. Abgesehen von einigen als irrelevante Intensitätsschwankungen bewertbaren Abweichungen zeigen dabei die Mutanten ein und derselben Komplementationsgruppen grundsätzlich vergleichbare Eigenschaften. Die einzigen deutlichen Ausnahmen sind ts 2100 (Komplementationsgruppe 194 a) und ts 3386 (Komplementationsgruppe 46), welche möglicherweise beide zu rho-Mutanten degeneriert waren.

Tab.12 Abbau der ATPase-Untereinheiten verglichen mit der Gesamt ATPase-Aktivität.

Die ATPase-Aktivität ist in %-Wildtyp-Aktivität aufgelistet. R= Reduzierte Intensität der entsprechenden Untereinheiten. Bezüglich Anzucht- und Testbedingungen vgl. Tab.1

pet-ts Mutante Nr.	Gesamt- ATPase-Ak- tivität	abgebaute Untereinheiten der ATPase Nr.
	%	
120	33	5R,6,7
143	35	7,8
221	100	WT
310	65	WT
313	129	4R,5R,7,8
326	54	WT
348	48	6,7,8
370	68	WT
379	8	3R,5R,6,7,8
390	72	WT
446	69	WT
487	66	6,7,8
491	14	WT
575	70	WT
576	67	WT
642	97	WT
714	12	WT
752	63	5R,6
785	60	1R,2R,4R,5R
787	28	6,7,8
892	95	WT

(Fortsetzung S.119)

Tab. 12 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Gesamt- ATPase-Ak- tivität	abgebaute Untereinheiten der ATPase Nr.
	%	
931	69	WT
1037	143	WT
1039	146	WT
1062	28	WT
1075	92	WT
1113	73	WT
1133	66	7,8
1138	13	WT
1186	51	6,7,8
1233	49	WT
1285	112	WT
1305	18	WT
1353	49	4,5R,6,7,8
1374	66	1R,2R,3R,4,5,6,7,8
1424	45	WT
1454	62	WT
1642	80	WT
1666	18	WT
1699	80	WT
1922	21	WT
2081	45	WT
2135	26	3R,5R,6,7,8
2240	11	WT
2262	52	3R,6,7,8
2270	66	WT
2281	46	6,7,8
2326	89	6,7

(Fortsetzung S.120)

Tab. 12 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Gesamt- ATPase-Ak- tivität	abgebaute Untereinheiten der ATPase Nr.
	%	
2337	18	WT
2398	48	6,7
2426	40	WT
2498	34	WT
2515	147	WT
2555	27	WT
2596	49	WT
2620	102	WT
2633	15	WT
2661	16	3R,4,5,6,7,8
2711	61	WT
2742	15	WT
2950	22	WT
2966	59	4R,5,6,7,8
2998	37	WT
3403	17	WT
3407	37	WT
3411	46	WT
3543	54	5R,8
3560	38	WT
3724	9	WT
3760	12	WT
3804	13	WT
3817	11	WT
3857	54	WT
3910	17	WT
4030	78	WT

(Fortsetzung S.121)

Tab. 12 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Gesamt- ATPase-Ak- tivität	abgebaute Untereinheiten der ATPase Nr.
	%	
4084	27	6,7
4243	34	WT
4246	77	3R,4R,5R,6,7
4271	133	WT
4519	73	WT
4753	46	WT
4937	87	WT
5061	11	3R,6,7,8
5181	62	3R,7

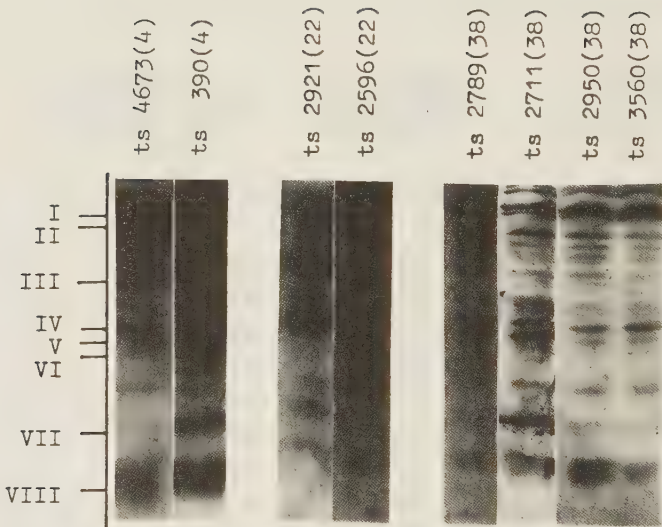
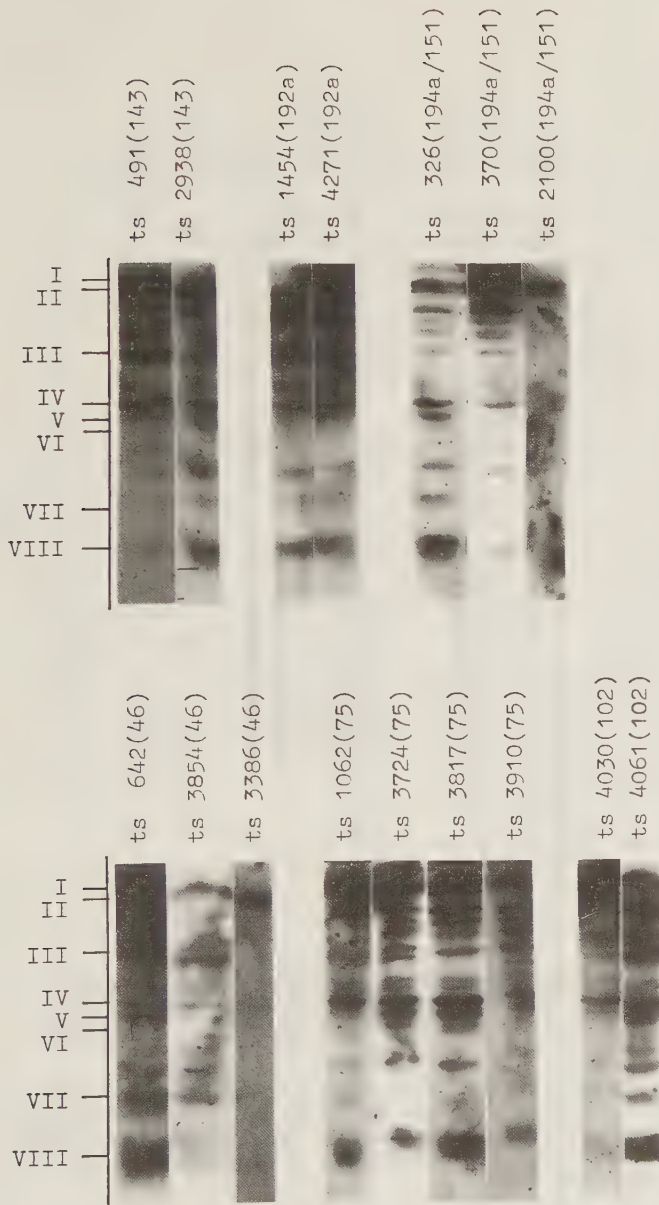


Abb. 24 Vergleich der "Western-Blot"-Analysen verschiedener pet-ts Mutanten aus gleichen Komplementationsgruppen.

Die verschiedenen Vertreter der Komplementationsgruppen 4, 22, 38, 46, 75, 102, 143, 192 und 194a/151 wurden miteinander verglichen. Die Original-Gelbilder der gezeigten Mutanten sind in Abb. 28 Bild 1 (ts 3910, ts 2789), Bild 2 (ts 3817, ts 2711), Bild 3 (ts 370), Bild 4 (ts 2950, ts 3560, ts 3724, ts 326), Bild 5 (ts 491), Bild 8 (ts 2596), Bild 11 (ts 4061), Bild 13 (ts 2921, ts 1454), Bild 16 (ts 2100), Bild 17 (ts 2938, ts 3386), Bild 19 (ts 390), Bild 20 (ts 4673, ts 4271, ts 642) und Bild 22 (ts 3854, ts 1062, ts 4030) zu sehen. Komplementationsgruppen-Nummern stehen in Klammern.



Fortsetzung Abb. 24

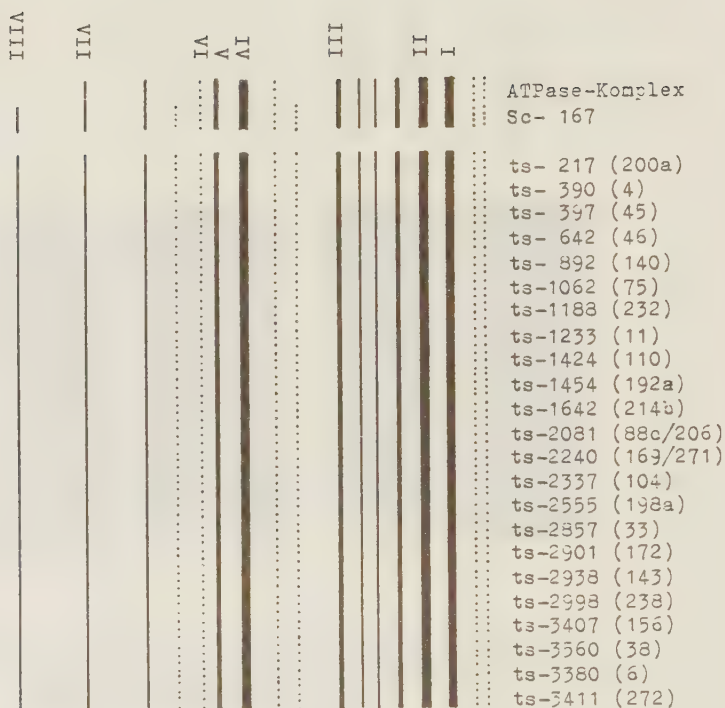


Abb. 25 Zusammenstellung und schematische Darstellung der "Western-Blot"-Bandenmuster aller in dieser Arbeit untersuchten pet-ts Mutanten.

Die Original-Gelbilder aller gezeigten Mutanten finden sich in Abb.28. Die Strichdicke entspricht den relativen Banden-Intensitäten in den Original-Gelbildern. Die Komplementation Gruppe jeder Mutante ist in Klammern angegeben.

IIIA	IIA	IA	AI	III	II	I	Sc- 167
							ts-3724 (75)
							ts-3854 (46)
							ts-3910 (75)
							ts- 366 (89a)
							ts-4061 (102)
							ts-5129 (55)
							ts- 630 (271)
							ts- 595 (93/199a)
							ts-2687 (29)
							ts- 326 (194/151)
							ts- 714 (209b)
							ts- 931 (174)
							ts-2498 (152)
							ts-2950 (38)
							ts- 507 (9/131)
							ts-4271 (192a)
							ts- 370 (194/151)
							ts-1670 (207b)
							ts-1699 (288)
							ts-2042 (168)
							ts-4673 (4)
							ts-3817 (75)
							ts-1646 (240)
							ts-4519 (82)
							ts-1285 (8)
							ts-3760 (209b)
							ts- 221 (123)
							ts-1037 (90c)
							ts-1039 (201)
							ts-1666 (52)
							ts-2288 (259)
							ts-2426 (250)
							ts-2523 (266)
							ts-2950 (38)
							ts-2742 (104)
							ts-2932 (237)
							ts-3403 (104)
							ts-3504 (128)
							ts- 491 (143)
							ts-1138 (39)
							ts-1937 (32)
							ts-2270 (175)

(Fortsetzung Abb. 25)

IIIA	IIA	IA	II	II	I	
—	—	—	—	—	—	Sc- 167
.....						ts-2789 (35)
.....						ts- 575 (49)
.....						ts-4030 (102)
.....						ts-1469 (78)
.....						ts-2711 (38)
.....						ts-2921 (22)
.....						ts- 576 (27)
.....						ts-4753 (16/94)
.....						ts-1261 (66)
.....						ts-5181 (198a/b)
.....						ts- 310 (99)
.....						ts- 532 (107)
.....						ts- 752 (203b)
.....						ts-2633 (104)
.....						ts- 296 (203a)
.....						ts-3804 (209b)
.....						ts-1305 (104)
.....						ts-1113 (35)
.....						ts-1922 (202c)
.....						ts-4243 (80)
.....						ts-1075 (207a)
.....						ts-2596 (22)
.....						ts-2092 (31)
.....						ts- 446 (83b/218)
.....						ts-4937 (13)
.....						ts-3543 (180)
.....						ts-2398 (120)
.....						ts- 046 (26)
.....						ts- 120 (76)
.....						ts-3654 (83a)
.....						ts-2326 (67)
.....						ts-4084 (3)
.....						ts- 97 (246)
.....						ts-1727 (281)
.....						ts-3407 (156)
.....						ts-4750 (40b)
.....						ts-2515 (96/75)
.....						ts-1133 (278/189)
.....						ts-1999 (95a/146)
.....						ts- 487 (105)
.....						ts- 787 (89b/119)
.....						ts-1186 (279)

(Fortsetzung Abb. 25)

IIIA	IIA	IA	II	III	II	I	Sc- 167
—	—	—	—	—	—	—	ts-1321 (230)
							ts- 379 (15/285)
							ts- 143 (44)
							ts-2281 (158)
							ts-2499 (157)
							ts-3332 (194c)
							ts-2620 (36)
							ts-3957 (3)
							ts-1339 (209a)
							ts-2262 (18)
							ts-5061 (211)
							ts-2276 (185)
							ts- 348 (138)
							ts-2135 (101c)
							ts-1353 (193b)
							ts-3420 (29)
							ts-3861 (216)
							ts- 785 (199a)
							ts-1629 (145)
							ts-2424 (64)
							ts-2343 (9)
							ts-4246 (188)
							ts-2583 (241)
							ts-3367 (248)
							ts-3386 (46)
							ts-4777 (21)
							ts- 313 (182)
							ts- 297 (24)
							ts-1558 (-)
							ts-1737 (200a)
							ts-2966 (238)
							ts-5034 (187)
							ts-4595 (260)
							ts-2661 (171)
							ts-1780 (256)
							ts- 454 (193a)
							ts-1374 (208)
							ts-3077 (199b/198)
							ts-2100 (194a/151)

(Fortsetzung Abb. 25)

5.) Vergleich der aus bc_1 -Komplex-, Cytochromoxidase- und ATPase-Seren gewonnenen "Western-Blot"-Analysen:

An diesem Institut wurden außer den in dieser Arbeit geschilderten Versuchen entsprechende immunologische Untersuchungen auch mit Antisera des bc_1 -Komplexes (18) und der Cytochromoxidase (30) unter Verwendung derselben pet-Mutanten durchgeführt. Im folgenden sollen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit denen der beiden anderen Versuchsreihen verglichen werden. In Tab. 13 a-h sind die Mutanten nach dem Grad des Abbaus der verschiedenen Untereinheiten von ATPase, bc_1 -Komplex und Cytochromoxidase zusammengefaßt. Nachfolgend werden Erläuterungen zu den in Tab. 13 a-h aufgelisteten Mutanten gegeben:

- a.) Wildtyp-Charakter: 18 % aller Mutanten besitzen für alle 3 Enzyme Wildtyp-Charakter. Die "Western-Blot"-Analysen zeigen in diesen Fällen keinen Abbau von Untereinheiten.
- b.) Mutanten, bei denen die ATPase Wildtyp-Charakter besitzt, die beiden anderen Enzymkomplexe aber teilweise abgebaut sind, stellen mit 30 % die zweitgrößte Gruppe dar. Dabei ist der bc_1 -Komplex meist stärker geschädigt als die Cytochromoxidase.
- c.) 7 % aller Mutanten besaßen bezüglich des bc_1 -Komplexes bei gleichzeitiger Schädigung der beiden anderen Enzymkomplexe Wildtyp-Charakter. Bei der ATPase sind dabei zwei bis vier Untereinheiten (vorwiegend VI, VII und VIII) und bei der Cytochromoxidase meist die Untereinheit VI gleichzeitig abgebaut.

- d.) In 6 % aller Fälle besaß nur die Cytochromoxidase Wildtyp-Charakter. Zwei bis fünf Untereinheiten von ATPase und bc_1 -Komplex waren abgeschwächt bzw. abgebaut.
- e.) Bei 7 % der Mutanten war lediglich die ATPase teilweise abgebaut. bc_1 -Komplex und Cytochromoxidase besaßen Wildtyp-Charakter.
- f.) Bei 15 % der Mutanten hatten ATPase und Cytochromoxidase Wildtyp-Charakter. Im bc_1 -Komplex waren ein bis vier Untereinheiten abgebaut, oft die Untereinheiten V und VII.
- g.) Bei 8 % der Mutanten war nur die Cytochromoxidase abgebaut. Es wurde das Fehlen von meist ein bis zwei Untereinheiten beobachtet. ATPase und bc_1 -Komplex hatten Wildtypcharakter.
- h.) Mutanten mit einem kombinierten Abbau aller drei Enzymkomplexe stellten mit 32 % die größte Gruppe dar.

Interessanterweise zeigten die Kapitel 4 c erwähnten, im Bandenmuster stark veränderten Mutanten ts 313, ts 297 und ts 1737 in den Autoradiogrammen mit Antisera gegen Cytochromoxidase und bc_1 -Komplex eine ähnliche abnormale Untereinheitenzusammensetzung. In allen 3 Fällen wurden erhebliche Abweichungen vom Wildtyp-Bandenmuster festgestellt. (18,30).

Auch bei den in Kapitel 4 d beschriebenen Mutanten mit einem Ausfall der ATPase-Untereinheit IV (ts 1922), ts 4243) waren in den Autoradiogrammen der beiden anderen Enzymkomplexe Ausfälle zu vermerken. Im bc_1 -Komplex wurde bei ts 1922 ein Ausfall der Untereinheit VIII, bei ts 4243 ein gegenüber dem Wildtyp stark abweichendes Muster festgestellt. Auch die Cytochromoxidase zeigte

Tab. 13 Vergleich der Untereinheiten-Muster von ATPase, bc₁-Komplex und Cytochrom-oxidase in verschiedenen pet-ts Mutanten.

Die jeweils fehlenden Untereinheiten der einzelnen Enzymkomplexe sind angegeben. WT bedeutet Wildtypcharakter, R= reduzierte Intensität der entsprechenden Untereinheiten. "neue Muster" bedeutet ein Bandenmuster, das vollständig verschieden ist vom Wildtyp-Bandenmuster des entsprechenden Enzymkomplexes. Ein vollständiges Fehlen des Enzymkomplexes wird mit "-" bezeichnet.

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm fehlende Untereinheiten von		
		ATPase	bc ₁ -Komplex	Oxidase
217	200a	WT	WT	WT
310	99	WT	WT	WT
370	194/151	WT	WT	WT
390	4	WT	WT	WT
630	271	WT	WT	WT
2270	175	WT	WT	WT
2711	38	WT	WT	WT
2789	38	WT	WT	WT
2857	33	WT	WT	WT
2921	22	WT	WT	WT

(a) Wildtyp-artige Muster.

(Fortsetzung S.131)

Tab. 13 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm fehlende Untereinheiten von		
		ATPase	bc ₁ -Komplex	Oxidase
2998	238	WT	WT	WT
3407	156	WT	WT	WT
3760	209b	WT	WT	WT
3804	209b	WT	WT	WT
4673	4	WT	WT	WT
5129	55	WT	WT	WT

(b) Fehlende Untereinheiten bei bc₁-Komplex und Cytochromoxidase.

221	123	WT	3, 4, 5	1R, 2, 3R, 6, 7
296	96/203a	WT	8	5, 6
491	143	WT	neue Muster	neue Muster
507	9	WT	2R, 4R	6
575	49	WT	5R, 6, 7, 8	2R, 7
642	46	WT	3R, 4R, 5R, 6R	6

(Fortsetzung S. 132)

Tab. 13 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm fehlende Untereinheiten von		
		ATPase	bc ₁ -Komplex	Oxidase
931	174	WT	5R, 6R, 7	7R
1039	201	WT	3R, 4R, 5R	1, 6
1062	75	WT	5R, 7	3
1138	39	WT	3R, 4R, 7	6, 7
1285	5	WT	3, 4, 6, 8	6, 7
1454	192a	WT	3R, 4R, 5R, 7, 8	6
1642	214b	WT	3, 4, 6, 7, 8	6, 7
1646	240	WT	2R, 3, 4, 6, 7, 8	neue Muster
1666	52	WT	-	1R, 2, 3, 6, 7
1922	202c	WT	3R, 4R, 8	2, 6, 7
1937	32	WT	3R, 4R, 8	2, 6, 7
2081	88c/206	WT	1R, 8	7
2240	169/271	WT	3, 4, 6, 7, 8	2, 6, 7
2426	250	WT	6, 7, 8	-
2498	152	WT	8	6, 7
2555	198	WT	6, 7, 8	6, 7

(Fortsetzung S. 133)

Tab. 13 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm ATPase	fehlende Untereinheiten von bc ₁ -Komplex	Oxidase
2901	172	WT	-	2,3,6,7
2950	38	WT	8	6
4030	102	WT	6R,7R,8R	6
4243	80	WT	neue Muster	4,5
(c) Fehlende Untereinheiten bei ATPase und Cytochromoxidase.				
1133	278/189	7,8	WT	6R
1186	279	6,7,8	WT	6
1727	281	7,8	WT	6
2620	36	6,7,8	WT	2,3
3645	83a	6,7	WT	2
3957	3	5,6,7,8	WT	6
4777	21	3R,4R,5,7,8	WT	4,5,6,7

(Fortsetzung S.134)

Tab. 13 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm fehlende Untereinheiten von		
		ATPase	bc ₁ -Komplex	Oxidase
(d) <u>Fehlende Untereinheiten bei ATPase und bc₁-Komplex.</u>				
120	76	5R, 6, 7	1R, 6	WT
752	203b/c	5R, 6	6, 7, 8	WT
1339	209a/b	5R, 6, 7	6R, 7R, 8	WT
1629	145	3R, 4R, 5R, 6, 7	6R	WT
1670	207b	5R	6R, 8	WT
5181	55	3R, 7	6, 7, 8	WT
(e) <u>Fehlende Untereinheiten der ATPase.</u>				
379	15	3R, 5R, 6, 7, 8	WT	WT
1046	26	6, 7	WT	WT
1075	207a	6	WT	WT
2092	31	6	WT	WT
2596	22	6	WT	WT

(Fortsetzung S. 135)

Tab. 13 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm ATPase	fehlende Untereinheiten von bc ₁ -Komplex	Oxidase
2687	29	3R, 4R, 5R, 6, 7, 8	WT	WT
3420	29	3R, 5R, 6, 7, 8	WT	WT
(f) Fehlende Untereinheiten des bc ₁ -Komplexes.				
326	194/151	WT	6R	WT
714	209b	WT	8	WT
1469	72	WT	8	WT
2042	168	WT	5R, 6R, 8	WT
2923	237	WT	6, 7, 8	WT
2938	143	WT	6, 7, 8	WT
3411	272	WT	3, 4, 6, 7, 8	WT
3504	128	WT	6, 7, 8	WT
3724	75	WT	6	WT
3817	75	WT	6, 8	WT
3854	46	WT	6	WT

(Fortsetzung S. 136)

Tab. 13 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm fehlende Untereinheiten von	ATPase	bc ₁ -Komplex	Oxidase
3910	75	WT	WT	6,7	WT
4271	192a	WT	WT	6R,7R,8R	WT
4519	82	WT	WT	3,4,6,7,8	WT
4753	16/94	WT	WT	6R,7R	WT
(g) Fehlende Untereinheiten der Cytochromoxidase.					
1188	232	WT	WT	WT	6,7
1261	66	WT	WT	WT	3,6
1305	104	WT	WT	WT	3
2337	104	WT	WT	WT	3R,4R,5R
2523	266	WT	WT	WT	6
2633	104	WT	WT	WT	3R
3403	104	WT	WT	WT	3
3560	38	WT	WT	WT	6

(Fortsetzung S.137)

Tab. 13 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm fehlende Untereinheiten von		
		ATPase	bc ₁ -Komplex	Oxidase
<u>(h) Fehlende Untereinheiten bei ATPase, bc₁-Komplex und Cytochromoxidase.</u>				
97	16	7,8	6	2,6,7
143	44	6,7,8	3,4,7	6,7
297	24	-	-	neue Muster
313	182	neue Muster	-	neue Muster
348	100	6,7,8	3,4,6,7,8	6,7
454	193a	-	-	-
487	105	6,7,8	5R,8R	2,6,7
1321	230	6,7,8	2R,3,4,5	6,7
1353	193b	4,5R,6,7,8	5R,7R	3
1374	208	-	-	-
1737	200a	-	-	neue Muster
1748	122	-	-	-
1780	256	-	-	-
1999	95a	6,7,8	2R,6R	2,6,7

(Fortsetzung S.138)

Tab. 13 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm ATPase	fehlende Untereinheiten von bc ₁ -Komplex	Oxidase
2100	194a/151	-	-	-
2262	18	3R,6,7,8	5R,6R	6,7
2281	158	6,7,8	6,7,8	7
2326	67	6,7	3,4,6,7	2,7
2398	120	6,7	6R,7,8	2,7
2424	64	6	3,4,6,7	neue Muster
2499	157	6,7,8	8	3,6,7
2515	96/75	7,8	6R,7R,8R	7
2583	-	3R,4R,5R,6,7	5R,7,8	2,6,7
2661	171	3R,4,5,6,7,8	6,7,8	2,6,7
2843	9	3R,4R,5R,6,7,8	-	2,6,7
3077	198a/199b	-	-	-
3332	194c	6,7,8	5R,7R,8R	-
3367	248	3R,4R,5R,6,7,8	5R,6R	-
3386	46	3R,4,5,6,7,8	3,4,8	6,7
3861	216	3R,4R,5R,7	8	7

(Fortsetzung S.139)

Tab. 13 (Fortsetzung)

pet-ts Mutante Nr.	Komplementations- gruppe Nr.	im Autoradiogramm ATPase	fehlende Untereinheiten von bc ₁ -Komplex	Oxidase
4084	3	7, 8	6, 7, 8	6, 7
4246	188	3R, 4R, 5R, 6, 7, 8	3, 4, 5, 6, 7, 8	2, 4, 5, 6, 7
5034	187	3R, 4R, 5R, 6, 7	6, 7, 8	neue Muster
5061	211	3R, 6, 7, 8	1R, 5R, 6R, 7, 8	neue Muster

bei beiden Mutanten bestimmte Ausfälle, die bei ts 1922 die Untereinheiten II, VI, VIII und bei ts 4243 die Untereinheiten IV und V betrafen (18,30).

Die ATPase-Mutanten der Komplementationsgruppe 104 zeigten bei ts 3403 und ts 1305 einen Ausfall, bei ts 2337 und ts 2633 eine Abschwächung von Untereinheit III der Cytochromoxidase. Parallel wurde in dieser Komplementationsgruppe auch eine Aktivitätsminderung der Cytochromoxidase um durchschnittlich 30 % beobachtet. Bei der ATPase-Mutante ts 714 der Komplementationsgruppe 209 b wurde lediglich ein Fehlen der bc_1 -Untereinheit VIII festgestellt, alle anderen Vertreter dieser Komplementationsgruppe zeigten Wildtyp-Charakter bezüglich der bc_1 -Komplex- und Cytochromoxidase-Muster. Die Tatsache, daß nach obiger Zusammenstellung in 30 % aller vergleichend untersuchten pet-ts Mutanten die ATPase Wildtyp-Charakter besaß, während dies bei Cytochromoxidase (6 %) und bc_1 -Komplex (7 %) wesentlich seltener der Fall war, deutet auf eine im Vergleich zu bc_1 -Komplex und Cytochromoxidase besonders hohe Stabilität dieses Enzyms in der Zelle hin. Dieser Effekt wurde auch bei den Inaktivierungskinetiken ausgewählter pet-ts Mutanten sichtbar. Die in Abb. 8 dargestellten Kinetiken zeigen, daß der Abfall der ATPase-Aktivität in den meisten Fällen deutlich geringer ausgeprägt war als bei den übrigen Atmungskettenenzymen. Im umgekehrten Fall, d.h. bei Mutanten mit proteinchemisch defektem ATPase-Komplex wurde stets auch ein gleichzeitiger von bc_1 -Komplex- und Cytochromoxidase-Komponenten beobachtet (s. Tab. 13 h).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß spezifische Einzeldefekte einzelner Untereinheiten der 3 untersuchten Enzymkomplexe selten waren. Demgegenüber stellte der kombinierte Abbau von Untereinheiten aller 3 Enzymkomplexe die vom Phänotyp her größte Gruppe (32 %) dar. Auffälligerweise zeigten Mutanten mit stark verändertem ATPase-Bandenmuster in allen Fällen auch ein abnormales Bandenmuster bei bc_1 -Komplex und Cytochromidase. Von den 3 untersuch-

ten Atmungsketten-Enzymkomplexen erwies sich die ATPase hinsichtlich der Erhaltung ihrer Enzymaktivität und ihrer Proteinstruktur als stabilstes Enzym. Dieses Enzym scheint demnach gegenüber Schädigungen des mitochondriellen Energiestoffwechsels deutlich unempfindlicher als die beiden anderen zu sein.

C. Vorversuche zur Transformierbarkeit von pet-ts Mutanten mit Hilfe einer Hefegenbank

Im vorangegangenen Teil die Arbeit waren pet-ts Mutanten von S. cerevisiae charakterisiert worden, welche einen spezifischen ATPase-Defekt aufwiesen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte versucht werden, durch Transformation und Komplementation dieser Mutanten mit einer Hefe-DNA-Genbank die betreffenden Gene in klonierter Form zu isolieren.

1.) Beschreibung der verwendeten Genbank

Die von uns verwendete Genbank war von F. Lacroute hergestellt worden (20). Als Vektor wurde dabei das Plasmid pFL 1 benutzt. Es setzt sich aus URA 3 Gen von S. cerevisiae, dem Eco R1-D Fragment der 2 μ m DNA von Hefe und dem E. coli Plasmid pBR 322 zusammen (Abb.26). Weiterhin besitzt es die Resistenzgene für Ampicillin und Tetracyclin. Letzteres geht durch den Einbau zusätzlicher Hefe-DNA Fragmente verloren. Diese Hefe-DNA Fragmente sind in die einzige Bam HI-Schnittstelle des Plasmids pFL 1 eingebaut. Es handelte sich bei ihnen um ein Sau III A Partialhydrolysat chromosomaler Gesamt-DNA aus Hefe. Die zur Transformation benutzte DNA der Hefegenbank wurde gewonnen, in dem das von F. Lacroute erhaltene Ligationsgemisch zunächst nach E. coli RRI transformiert wurde. Um einen repräsentativen Querschnitt aller in der Genbank enthaltenen Hefe-DNA Fragmente zu erhalten, wurden von diesen E. coli Transformaten mehr als 40.000 Klone gesammelt und zusammen angezüchtet. Hieraus wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, die Plasmid-DNA isoliert. Um die Qualität des ursprünglichen Ligationsgemisches zu testen, wurden nach der E. coli-Transformation 24

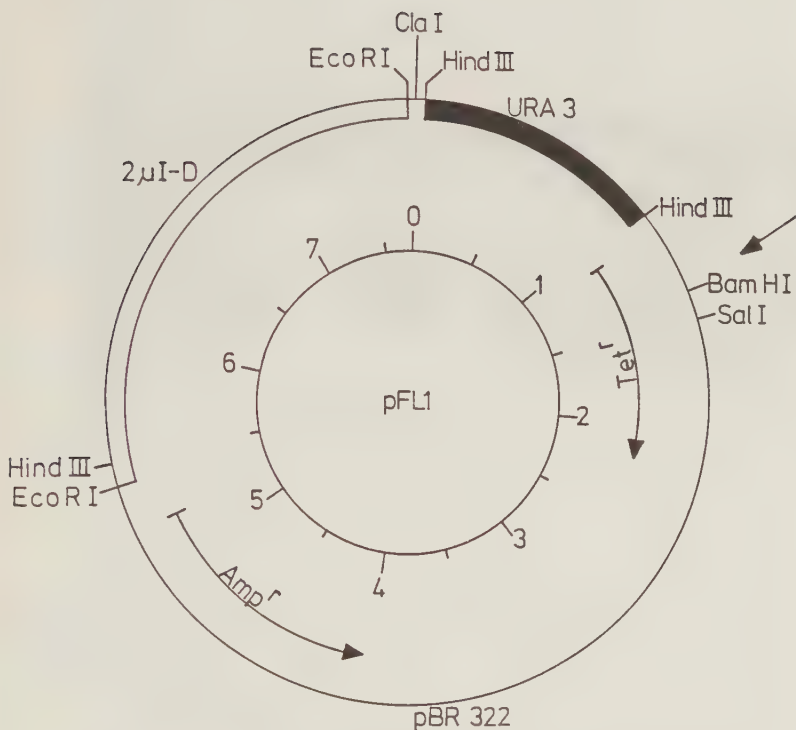


Abb. 26 Restriktionskarte des Plasmids pFL 1.

Das Plasmid pFL 1 besteht aus dem Eco R1-D Fragment der 2 μ-DNA von Hefe (■), dem URA 3 Gen von Hefe (▢) und der pBR 322 DNA (—). Die Größe des Plasmids beträgt 7,65 kb. Klonierte Hefe-DNA wurde in die einzige Bam H1 - Schnittstelle (Pfeil) eingebaut.

willkürlich ausgewählte Klone einzeln angezüchtet und die Plasmid-DNA jedes Klons nach der "mini screen" - Methode (s. Material und Methode) isoliert. Die jeweilige Plasmid-DNA wurde einer Restriktionsanalyse mit Hind III/Sal I unterworfen und in Agarosegelen elektrophoretisiert. Bei der Restriktionsanalyse des reinen Vektors treten dabei 4 Banden auf (Abb. 27 Bahn b). Die beiden zusätzlichen schwachen Banden in Bahn b lassen sich auf eine unvollständige Verdauung des Vektors zurückführen. Im Bereich von 4 kb befindet sich das pBR 322-Fragment, die 2 μ m DNA ist das zweitgrößte und das URA 3 Gen das drittgrößte Fragment.

Die Fremd-DNA wurde bei dieser Genbank in das kleinste Hind III/Sal I Vektorfragment (0,4 kb), d.h. in die einzige Bam HI-Stelle des Vektors eingebaut. (s. Abb. 26) Der Einbau macht sich durch eine Verschiebung dieses Vektorfragments und evtl. auch durch das Auftreten neuer Banden bemerkbar (s. Abb. 27, Bahn c, q). Wie aus Abb. 27 hervorgeht, hatten insgesamt ca. 60 % der Plasmide eine Insertion von 2-6 kb. Etwa 20 % der untersuchten Klone enthalten reine Vektor-DNA ohne Insertionen (z.B. Abb. 27, Bahn l, r). Ein Fehlen des URA 3 - Fragments bzw., in einem Fall, der 2 μ m-DNA Bande (Abb. 27, Bahn x) wurde bei weiteren 20 % der Klone beobachtet.

2.) Darstellung von stabilen ura 3/pet-ts Doppelmutanten für die Hefetransformation

Um die Aufnahme eines Plasmids der Genbank in die Hefezelle besonders deutlich nachweisen zu können, wurden die atmungsdefizienten pet-ts Hefemutanten zusätzlich noch mit einer ura 3-Mutation versehen. Dies erfolgte durch Kreuzung mit einer ura 3-Mutante und anschließender statistischer Sporenselktion. Die Einzelheiten der Versuchsdurchführung sind in Material und Methoden beschrieben.

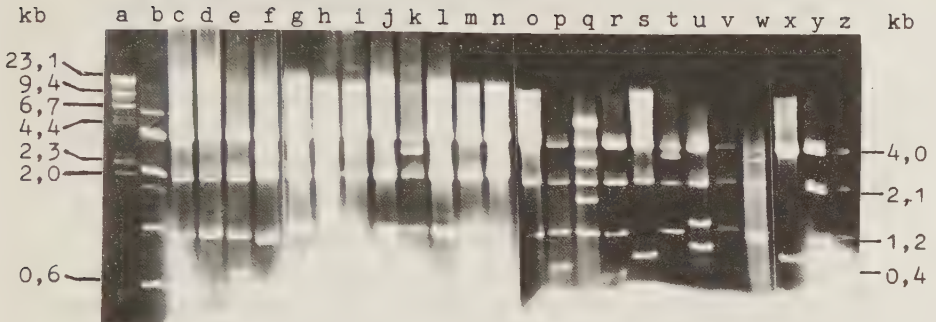


Abb. 27 Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA von 24 willkürlich ausgewählten Klonen der Lacroute-Genbank.

Aus 40.000 Klonen der Genbank wurden 24 einzelne Klone angezogen und nach der "mini screen" - Methode aus ihnen die Plasmid-DNA isoliert. 5 Mikroliter der jeweiligen DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 15 Mikroliter mit je 1 U der Restriktionsendonukleasen Hind III und Sal I für 3 Stunden bei 37° C inkubiert und in 0,8 %igen Agarose-Gelen elektrophoretisiert (Bahnen (c) - (z)). Als Kontrolle dienten das Plasmid pFL 1 ohne eingebaute Hefe-DNA (Bahn b) und eine Hind III geschnittene Lambda-DNA (Bahn a). Vektorbanden sind durch Pfeile markiert.

Besondere Sorgfalt wurde auf die Auswahl möglichst Reversions-stabiler Mutanten verwandt. Nach der Transformation der Hefeprotoplasten wurden zunächst auf URA-Selektionsplatten bis zu 1500 Klone pro Platte angezüchtet. Eine Übertragung von Einzelklonen von da auf URA-Lactat-Selektionsplatten (36 °C) war technisch unmöglich. Daher wurde der Weichagar der URA-Selektionsplatte zusammen mit den in ihn eingebetteten URA-Prototrophen mit sterilem Wasser homogenisiert. So war gewährleistet, daß von jedem Klon zumindest einige Zellen im Wasser suspendiert wurden. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 0,3 ml auf URA-Lactat-Selektionsplatten (36 °C) ausgestrichen. Die auf diesen Platten dann auswachsenden Einzelklone waren entweder Transformanten oder Revertanten. Die Anzahl der Revertanten versuchten wir durch besonders kritische Auswahl der pet- Mutanten hinsichtlich ihrer Reversionsneigung einzuschränken (vgl. Material und Methoden). Allgemein war eine hohe Reversionsstabilität bei unseren pet-ts Mutationen nicht oft gegeben. Generell wurden für Transformationsversuche nur solche ura 3/pet-ts Doppelmутanten verwendet, die auf einer 36 °C Lactat-Platte keinen einzigen Revertantenklon zeigten. Weiterhin wurden die Zellen auch noch nach der Anzucht, d.h. kurz vor der Protoplastierung und Transformation routinemäßig auf Revertanten getestet. Eine zusätzliche Absicherung erhielt man, indem die einzelnen URA-Selektionsplatten der transformierten Mutanten getrennt verarbeitet wurden und die erhaltene Suspension auf je eine URA-Lactat Selektionsplatte (36 °C) ausstreicht. Im Fall einer Spontanreversion bei der Anzucht würden auf allen URA-Lactat-Selektionsplatten gleich viele prototrophe Kolonien erscheinen. Im Falle einer Transformation sollten dagegen nur auf einer von mehreren Platten desselben Experimentes Kolonien wachsen. Es wurden hauptsächlich die pet-Mutanten der Komplementationsgruppen 104 für Transformationszwecke verwendet.

3.) Transformation von pet-ts Mutanten

Es wurden insgesamt 16 verschiedene pet-ts Mutanten mit der oben geschilderten S. cerevisiae Genbank transformiert. Tab. 14 faßt die dabei erhaltenen Ergebnisse zusammen. Demnach ergab sich eine unterschiedliche Transformierbarkeit, selbst verschiedener Sporen von ursprünglich derselben Mutante. Die Transformationsrate schwankte zwischen 2000 Kolonien pro 10 Mikroliter DNA auf einer Agarplatte bei ts 2337-7 und nicht transformierbaren Sporen bei ts 4673 d. Bei der Mutante ts 2742-1 war offensichtlich der ura 3-Marker revertiert, was daraus hervorgeht, daß auch ohne DNA-Zugabe eine URA-Prototrophenbildung zu beobachten war. Die übrigen Stämme waren mehr oder weniger frei von spontanen ura 3-Revertanten und wurden daraufhin überprüft, ob sich unter den zunächst isolierten ura 3 Transformanten auch solche befanden, die in der Lage waren, unter nicht permissiven Bedingungen auf Lactat zu wachsen. Dazu wurden die Stämme auf Lactat-Festmedium ohne Uracil übertragen und bei 36 °C bebrütet. Bei 2 Mutanten (ts 1305-1 und ts 2633-1) wuchsen unter diesen Bedingungen einige Klone. Bei ts 1305-1 waren auf einer von 6 Lactatplatten nach 8 Tagen ungefähr 80 Kolonien zu sehen. Nach 3 Tagen wuchsen bei der Mutante ts 2633-1 auf einer von insgesamt 8 Platten 300 Klone. Alle anderen transformierten Mutanten zeigten kein Wachstum unter nicht permissiven Selektionsbedingungen. Die potentiellen Transformanten ts 1305-1 und ts 2633-1 wurden auf mitotische Stabilität getestet. Dieses geschah durch mehrmaliges Überstempeln der Kolonien auf YEP-Festmedien und Kultivation der Kolonien über Nacht. Anschließend wurden die Kolonien auf einmal auf Lactat- (36 °C) und URA-Selektionsmedium gestempelt. Mitotisch instabile Klone sollten auf den entsprechenden Selektionsplatten nicht wachsen. Bei beiden Mutanten wurde jedoch mitotische Stabilität der Prototrophen festgestellt. Zur

Tab. 14 Transformation von ura 3/pet-ts Mutanten mit einer S.cerevisiae Genbank im Vektor pFL 1.

Die angegebene Zahl der URA 3-Prototrophen mit DNA ist die Gesamtzahl der auf mehrere Agarplatten verteilten Hefekolonien.

Exp. Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

pet-ts Mutante Nr.	Komplemen- tations- gruppe Nr.	Ausgangs- menge pet- Mutanten	Regenerierte Protoplasten	URA 3-Prototrophe	
				ohne DNA	mit DNA
		x 10 ⁻⁸	%		
1305- 1	104	5,1	34	0	3000
1305- 3	104	0,7	43	0	5600
2337- 7	104	2,3	26	0	8000
2337- 8	104	2,1	29	0	320
2633- 1	104	1,5	35	2	8000
2633- 4	104	4,6	33	9	16000
2742- 1	104	5,6	28	220	1200
2742-14	104	3,2	33	5	5000
2742-15	104	6,2	21	0	150
3403- 8	104	0,7	17	4	40
3724	75	1,4	22	0	1500
3854 a	46	6,2	33	4	200
3854 f	46	3,5	29	1	60
3854 h	46	2,1	32	0	6000
3854 k	46	0,9	32	1	1600
4673 d	4	4,5	29	0	0

Isolierung der in ts 1305-1 und ts 2633-1 enthaltenen Plasmide wurde jeweils die Gesamt-DNA der Hefezellen isoliert und nach E. coli transformiert. Es stellte sich jedoch heraus, daß selbst bei mehrmaliger Wiederholung keine E. coli-Transformanten erhalten wurden. Offensichtlich enthielten die Hefe-Zellen in beiden Fällen keine autonom replizierenden Plasmide. Dies könnte einmal mit der bekannten leichten integrativen Transformation von 2 μ m-haltigen Plasmiden zusammenhängen. Zum anderen könnte eine solche mit einer Genbank, die das gesuchte Gen nicht intakt enthält, die einzige Möglichkeit sein, Prototrophe zu erzeugen. Schließlich könnte die experimentelle Durchführung der Transformation in 2 Stufen (zuerst bzgl. URA 3, dann bzgl. PET) die Selektion spontaner Revertanten begünstigt haben. Künftige experimentelle Verbesserungen werden auf der Grundlage solche Überlegungen zu entwerfen sein.

IV DISKUSSION

Die im 1. Teil dieser Arbeit durchgeführten enzymologischen Untersuchungen an pet-ts Mutanten haben gezeigt, daß bei den meisten untersuchten Mutanten (75 %) gekoppelte Ausfälle von 2 oder mehreren Atmungsketten-Enzymaktivitäten auftraten. Bei einer in früheren Arbeiten gefundenen und mit den verwendeten Präparationsmethoden und Atmungsketten-Enzymtests zusammenhängenden Meßungenauigkeit von ca. 20 % verstehen wir unter Aktivitätsausfällen eines Enzymkomplexes eine Reduktion seiner Aktivität um mindestens 80 %. Spezifische Ausfälle, also die Reduktion nur einer Enzymaktivität, während die restlichen Atmungsketten-Enzymaktivitäten jeweils 70 % der Wildtyp-Aktivitäten betrug, wurden lediglich bei 2 Enzymkomplexen gefunden: der Cytochromoxidase und der ATPase. Der spezifische Ausfall der Cytochromoxidase wurde bei einer relativ großen Zahl der durchgetesteten Mutanten (21 %) bemerkt. Grundsätzlich ähnliche Ergebnisse mit Atmungsdefekten Mutanten wurden - allerdings mit einer kleineren Zahl untersuchter Mutanten - mit einem Verhältnis pleiotroper zu spezifisch Cytochromoxidase-defekter Mutanten von 56 % : 44 % (51) und 71 % : 6 % (52) von anderen Autoren beschrieben. Diese relativ hohe Zahl von spezifischen Ausfällen der Cytochromoxidase läßt eine besondere Empfindlichkeit dieses Enzyms gegenüber Schädigung des mitochondriellen Energiestoffwechsels vermuten. Bei den hier untersuchten pet-ts Mutanten wird nach der Temperaturerhöhung von 22 °C auf 36 °C, abhängig von der Art der jeweiligen Mutation, ein vorgebildetes aktives Protein mehr oder weniger rasch (abhängig von der betreffenden Protein-Umsatzrate und der entsprechenden Poolgröße) in der Zelle ausverdünnt und durch inaktives Protein ersetzt. Als Folge davon nimmt die ATP-Syntheserate und damit auch das ATP/ADP-Verhältnis der Zelle ab. Dadurch könnten auch andere Proteine, und zwar alle mit relativ hoher Umsatzrate, aufgrund absinkender Nachsynthese betroffen werden und mengenmäßig mit absinken. Der rasche Aktivitätsverlust der Cytochromoxidase und das häufige Auftreten von Mehrfachdefekten könnten darin eine Ursache haben.

Weitere Untersuchungen an diesem Institut (28) haben gezeigt, daß auch unter extremen Kulturbedingungen, z.B. in Laktatmedien unter Mangelbedingungen, d.h. weit in die stationäre Phase hinein, oder nach Entzug der Kohlenstoffquelle sowie nach Zusatz von Hemmstoffen der mitochondriellen Atmungskette und cytoplasmatische Proteinsynthese, unspezifische Aktivitätsverluste der Atmungskettenenzyme als Folge dieser Bedingungen auftreten können. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, können in einem Medium mit 1 % Galaktose als Kohlenstoffquelle solche Effekte vor Erreichen der stationären Phase verhindert werden. Katabolitrepersions-Effekte waren bei diesen Anzuchtbedingungen noch nicht in nennenswertem Umfang vorhanden. Aus diesem Grund kann die hohe Anzahl von Mehrfachdefekten tatsächlich eher mit der Mutation und weniger mit unspezifischen, auf extreme Kulturbedingungen zurückzuführende Effekte in Zusammenhang gebracht werden.

Im Fall der ATPase kristallisierten sich bei den Reihenuntersuchungen von 195 Komplementationsgruppen lediglich 2 Komplementationsgruppen als spezifisch ATPase negativ heraus und zwar die Gruppen 104 und 209b. Aufgrund der oben erwähnten Meßungenauigkeit bei der Bestimmung der Atmungsketten Enzymaktivitäten waren wir gezwungen, jeweils mehrere (3 bzw. 5) Vertreter dieser ATPase-negativen Komplementationsgruppen durchzutesten. Bei allen 8 Vertretern wurde eine spezifische Mutation nach den oben gegebenen Kriterien verifiziert. Die Mutanten aus anderen Komplementationsgruppen mit einer ATPase-Aktivität von 20 % der Wildtypaktivität zeigten in den meisten Fällen eine weitgehende Pleiotropie, die alle Komponenten der Atmungskette betraf. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Autoren für eine Reihe von S. cerevisiae (52,58) und S. pombe (56) Mutanten beschrieben. Die im weiteren Verlauf der Arbeit festgestellte relativ hohe Stabilität des ATPase-Komplexes gegenüber Abbauprozessen in Mutantenzellen könnte dieses Phänomen erklären.

Die bei einigen spezifisch ATPase-negativen Vertretern durchgeführten "Western-Blot"-Analysen zeigten Wildtyp-artige Bandenmuster. Es fehlten weder Untereinheiten noch waren Anreicherungen von Vorstufen zu beobachten. Alle untersuchten Mutanten der ATPase-negativen Komplementationsgruppen zeigten im Rahmen der in dieser Arbeit möglichen Interpretationsgenauigkeit gleiche Bandenmuster. Die entsprechenden Autoradiogramme waren reproduzierbar. Das Auftreten von wildtypartigen Bandenmustern spricht für eine Punktmutation in einem der ATPase-Strukturgene. Die eingebaute "falsche" Aminosäure könnte dann bei nichtpermissiver Temperatur zu einer Konformationsänderung und damit zu einer Aktivitätsminderung des Enzyms führen. In einem solchen Fall wären trotz stark reduzierter Aktivitäten keine Veränderungen von ATPase-Bandenmustern in den Autoradiogrammen zu erwarten. Auch in den Autoradiogrammen von bc_1 -Komplex und Cytochromoxidase hatten die Vertreter der Komplementationsgruppen 104 und 209b mehr oder weniger Wildtyp-artigen Charakter. Bei Mutanten der Gruppe 104 war die Untereinheit III der Intensität mengenmäßig reduziert bzw. nicht vorhanden, bei Gruppe 209b wurde bei einer Mutante das Fehlen der Untereinheit VIII in bc_1 -Komplex festgestellt. Dieser wildtypartige Charakter von bc_1 -Komplex und Cytochromoxidase auf Proteinebene sollte aufgrund der durchgeführten Atmungsketten-Aktivitätstests zu erwarten sein.

In der Tat ist es überraschend, daß überhaupt Mutanten mit spezifischem ATPase-Defekt gefunden wurden. Aufgrund einer fehlenden mitochondriellen ATP-Synthese hätte eine erniedrigte Protein-synthese und damit verbunden ein unspezifischer Abbau von Atmungskettenproteinen vermutet werden können. Eine Erklärung des spezifischen ATPase-Defektes könnte dadurch gegeben werden, daß die aktive Form der ATPasetemperaturstabil ist, einen relativ großen Vorstufen-Pool besitzt und gleichzeitig keiner hohen Protein-Umsatzrate unterliegt. Dann wird die aktive Form nur langsam infolge Substitution durch die inaktive Form aus der Zelle ausverdünnt. Daher könnte die gemessene Reduzierung der ATPase-Aktivität erst relativ kurz vor dem Absterben der Zellen erreicht werden, so daß sich ein pleiotroper Effekt noch nicht ausbreiten konnte.

Zur weiteren Charakterisierung der spezifischen ATPase-Mutanten wäre es nötig gewesen, die betroffenen Gene zu isolieren. Doppelmutanten mit einem URA 3-Marker konnten nur bei Komplementationsgruppe 104 hergestellt werden. Bei allen Vertretern der Komplementationsgruppen 209b konnte das Markergen nicht eingekreuzt werden. Daher wurden die Vorversuche zur Transformierbarkeit von pet-ts Mutanten vorwiegend mit Vertretern der Komplementationsgruppe 104 durchgeführt. Die Isolierung und Klonierung der spezifischen Plasmide aus den während der Transformationsversuche selektionierten Zellen war jedoch nicht möglich. Eine Integration des Plasmids mit anschließender Ausverdünnung (57) oder eine Spontanreversion der pet-ts Mutation käme als Erklärung in Frage. Ähnliche Transformationsversuche sollten daher auch noch mit anderen Genbanken durchgeführt werden. Ist das komplette Gen in der Genbank enthalten, was bei der hier verwendeten Genbank nicht unbedingt der Fall sein muß, könnte die Wahrscheinlichkeit einer Komplementation des mutierten Gens in der gleichen Größenordnung liegen wie die auftretenden Spontanreversionen der verwendeten pet-ts Mutante.

Im 2. Teil der Arbeit wurde bei einer größeren Anzahl von pet-ts Mutanten, einschließlich der schon diskutierten ATPase Mutanten, die ATPase-Untereinheitenmuster mit immunologischen Methoden untersucht. In S. cerevisiae besteht der ATPase-Komplex, gemäß herkömmlicher SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aus 9 Untereinheiten in einem Molekulargewichtsbereich von 56 bis 8 kDa (31, 48). In dieser Arbeit sind im CBB-gefärbtem Gelbild nur die Untereinheiten I-VI deutlich zu erkennen. In der "Western-Blot"-Analyse konnten noch im Wildtyp-Rohextrakt die Untereinheiten VII und VIII sichtbar gemacht werden. Im Autoradiogramm waren die mitochondriell kodierten Untereinheiten VI nur sehr schwach (im Gegensatz zum CBB-gefärbten Gel) und IX überhaupt nicht zu erkennen. Die mitochondriell kodierten Untereinheiten scheinen also wenig immunogen zu sein. Die Frage der Reproduzierbarkeit des im Autoradiogramm entstehenden Bandenmusters konnte durch eine Gegenüberstellung von Wildtyp-Rohextrakten aus verschiedenen Gelen abgeschätzt werden. Im Bereich von Untereinheit VI und VIII schwankt die relative

Intensität homologer Banden, sonst ist im allgemeinen eine recht zufriedenstellende Übereinstimmung der Bandenmuster gegeben. Ein weiteres Kriterium der Reproduzierbarkeit von Zellanzucht, Präparation der Zellrohextrakte und "Western-Blot"-Analyse stellt der Vergleich der Autoradiogramme verschiedener Vertreter gleicher Komplementationsgruppen dar. Mit wenigen Ausnahmen zeigten die Mutanten innerhalb einer Komplementationsgruppe vergleichbares immunologisches Verhalten.

Bei routinemäßige Durchtesten der Zellrohextrakte mit ATPase-Antiserum wurde bei mehr als der Hälfte der Mutanten (59 %) Wildtyp-artiges Bandenmuster beobachtet. Dagegen fand man bei den gleichen Versuchen mit bc_1 -Antiserum 40 %, bei Cytochromoxidase-Antiserum nur 37 % Mutanten mit Wildtyp-artigen Bandenmustern. Weitere Hinweise für eine relativ hohe Stabilität des ATPase-Komplexes lassen sich aus der Gegenüberstellung der mit bc_1 -, Cytochromoxidase - und ATPase - Antiseren gewonnen Autoradiogramme finden. Zum Beispiel besaß bei 30 % aller gegenübergestellten Mutanten die ATPase ein Wildtyp-artiges Bandenmuster, während gleichzeitig bei bc_1 -Komplex und Cytochromoxidase Ausfälle von Untereinheiten zu vermerken waren. Auch die durchgeführten Inaktivierungskinetiken zeigten, daß der relative Abfall der ATPase-Aktivität weniger stark ausgeprägt war als bei dem Rest der Atmungskettenenzyme.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden spezifische, proteinchemisch nachweisbare Einzeldefekte nur für die ATPase-Untereinheit IV in 2 Mutanten gefunden (ts 1922 (202c) und ts 4243 (80)). Bei diesen beiden Mutanten trat eine Bande im Bereich von ca. 27 kDa vergleichsweise stärker hervor. Bei diesen Banden könnte es sich um ein Vorläuferprotein der Untereinheit IV handeln.

Starke Abweichungen vom Wildtyp-Bandenmuster zeigten die Mutanten ts 297 (24), ts 313 (182) und ts 1558 (-). Bei diesen Mutanten, die abgeschwächte Untereinheiten IV und V besitzen, fällt ein deutliches Hervortreten einer Bande bei 18,2 kDa auf. Ob es sich bei diesen Mutanten um Vorstufen der Untereinheiten VII und VIII handelt, oder um Abbauprodukte der Untereinheiten IV und V könnte erst durch den Einsatz spezifischer Antikörper gegen kernkodierte Untereinheiten entschieden werden. Weiteres auffälliges Merkmal dieser 3 Mutanten und zusätzlich ts 1737 (200a) war die Verdoppelung der Untereinheit III. Das von Schatz gefundene Vorläuferprotein (34) ist allerdings um 8 kDa größer und kann daher nichts mit der direkt über Untereinheit III auftretenden Bande zu tun haben. In den durchgeführten "Western-Blot"-Analysen mit Cytochromoxidase - (30) und bc₁ - Antiseren (18) wird die Mutante ts 313 in beiden Fällen als sehr stark abweichend vom Wildtyp-Bandenmuster beschrieben. Die Autoren weisen darauf hin, daß sich in dieser Mutante eine Vielzahl von Vorstufen angereichert haben könnte. Weiter ist bei dieser Mutante bekannt, daß sich die Atmung nicht durch Cyanid hemmen läßt (55). Zukünftige Untersuchungen dieser Mutante, wie Genklonierung und Bestimmung von Vorläuferproteinen und Abbauprodukten könnten tiefere Einblicke in Import- und Prozessierungsmechanismen der kernkodierten Atmungskettenproteine bringen.

Die 5 Untereinheiten der F₁-ATPase werden höchstwahrscheinlich als diskrete cytoplasmatische Vorläuferproteine gemacht. Die Vorstufen der 3 größten Untereinheiten (I,II,III) sind bekannt und werden 2 - 6 kDa größer hergestellt als die entsprechenden Untereinheiten im aktiven ATPase-Komplex (34,44). Die Translokation der Vorstufen erfolgt unter Benutzung des Membran-Potentialgefälles der inneren Mitochondrienmembran. Die N-terminalen Teile der Vorläuferproteine werden bei der Prozessierung der Untereinheiten I, II und III abgespalten. (34, 44) Im Fall der Untereinheit II geschieht dies durch eine von Douglas isolierte Endoprotease (54). Die prozessierten Untereinheiten werden im intakten Mitochondrium zusammengebaut. Der Zusammenbau von zellfrei synthetisierten F₁-Vorläuferproteinen in isolierten intakten Mitochondrien wurde von Norman beschrieben (53). Für diese

Arbeit stellt sich die Frage, weshalb Ausfälle bestimmter Untereinheiten bei gleichzeitiger Anhäufung der entsprechenden Vorstufen (mögliche Ausnahme evtl. Untereinheit IV), nicht nachgewiesen werden konnten. Die bei den meisten Autoradiogrammen auftretenden Banden im Bereich zwischen 56 und 65 kDa könnten als Vorläuferproteine von Untereinheit I und II gedeutet werden. Dagegen spricht, daß diese Banden auch im Autoradiogramm des isolierten ATPase-Komplexes in gleicher Intensität vorhanden sind. Bei der ATPase-Isolierung aus intakten Mitochondrien ist kaum anzunehmen, daß Vorstufen mit angereichert wurden. Weiterhin scheint das Fehlen von Untereinheiten bzw. das Auftreten von Vorstufen zumindest bei den ATPase-Untereinheiten I und II ein relativ seltenes Ereignis zu sein. Goffeau (56) selektionierte aus 979 atmungsdefizienten Hefemutanten (*S. pombe*) nur 3 mit einer eindeutigen Veränderung der ATPase-Untereinheiten I und II. In einem Fall wurde höchstwahrscheinlich das Vorläuferprotein von Untereinheit II angereichert, bei den anderen beiden Mutanten fehlte jeweils Untereinheit I oder II. Auf die relativ geringe Wahrscheinlichkeit, spezifische ATPase-Mutanten aus einer Reihe atmungsdefekter Zellen herauszufinden, weisen auch andere Autoren hin (52, 58). Tzagoloff (52) beispielsweise selektionierte aus 3000 atmungsdefekten Mutanten nur 3, die eine spezifische ATPase Mutation besaßen. Aus einer dieser Mutanten wurde aufgrund des nachgewiesenen Ausfalls der Untereinheit II des Gen dieser Untereinheit isoliert (59).

In fast allen Autoradiogrammen der Zellrohextrakte und des gereinigten Enzyms liegt im Bereich der Vorstufe der ATPase-Untereinheit III (40 kDa) eine unspezifische Bande mit hoher Intensität. Eine eventuelle Anreicherung dieser Vorstufe kann daher nicht nachgewiesen werden. Weiterhin dürfte die Sichtbarmachung von angereicherten Vorstufen der Untereinheiten VII und VIII wegen der relativ geringen Intensitäten dieser Untereinheiten problematisch sein. In der Literatur ist von spezifischen ATPase-Mutanten mit Ausfällen bzw. Anreicherungen von Vorstufen der Untereinheiten IV, V, VII und VIII nichts bekannt. In der Tat wurden immer nur Mutanten mit Veränderungen der Untereinheiten I und II beschrieben (51, 52, 56, 58, 59).

Daher erscheint es wichtig, die Mutanten ts 1922 (202c) und ts 4243 (80) mit einer möglichen Anreicherung der Vorstufe der Untereinheit IV näher zu untersuchen. Diese Problematik könnte am Anfang durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen die Untereinheit IV angegangen werden. Dadurch lassen sich evtl. Aussagen über einen möglichen Prozessierungsdefekt machen. Danach könnte versucht werden, das betroffene Gen zu isolieren.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden enzymologische und immunologische Untersuchungen an temperatursensitiven nuklearen *pet*-Mutanten der Hefe *S. cerevisiae* durchgeführt. Sie hatten das Ziel, Komplementationsgruppenspezifische Defekte, vor allem der ATPase, in den einzelnen Mutanten zu charakterisieren.

1) Mit *S. cerevisiae* Wildtyp-Stämmen wurden Aktivitäten der Enzyme der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung bei 36° C in Abhängigkeit von der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle zeitlich verfolgt. Es wurde gefunden, daß sich Galaktose am besten als Kohlenstoffquelle für die Anzucht der *pet-ts* Mutanten eignet, da hierbei die Katabolid-Repression der Atmungsketten-Enzyme am geringsten war.

2) Mit 8 Mutanten wurden Inaktivierungskinetiken der Enzyme der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung bei nicht permissiver Temperatur (36° C) aufgenommen. Hierbei wurde der Zeitpunkt ermittelt, zu dem bei Reiherversuchen die verschiedenen Enzym-Aktivitäten nach Erwärmung der Kultur auf 36° C verläßlich gemessen werden konnten.

3) 220 Mutanten aus 195 Komplementationsgruppen wurden nach Anzucht unter nicht permissiven Bedingungen auf mutationsbedingte Inaktivierung bestimmter Atmungsketten-Aktivitäten untersucht. Einzeldefekte der Cytochromoxidase traten in 47 Komplementationsgruppen auf. Weiterhin wurden 2 Komplementationsgruppen gefunden, die spezifisch ATPase-negativ waren. Alle anderen untersuchten Mutanten wiesen Doppel- oder Mehrfachdefekte unterschiedlicher Komponenten der mitochondrialen Atmungskette auf.

4) Der ATPase-Gesamtkomplex wurde aus Hefemitochondrien isoliert.

5) Durch Immunisierung von Kaninchen wurden Antiseren gegen SDS denaturiertes Gesamtenzym hergestellt und auf Spezifität und Reinheit überprüft. Die Untereinheiten-Zusammensetzung des Komplexes und die Molekulargewichte der Untereinheiten wurden durch "Western-Blot"-Analyse bestimmt und mit den in der Literatur angegebenen Werten der anderen Autoren verglichen.

6) Zellrohextrakte von 149 *pet-ts* Mutanten aus 134 Komplementationsgruppen wurden durch SDS-Gelelektrophorese der Zellextrakte und anschließender "Western-Blot"-Analyse mit ATPase-Antiserum immunologisch untersucht. 88 Mutanten zeigten dabei ein Wildtypartiges ATPase Bandenmuster, bei zwei Mutanten war ein spezifischer Ausfall der Untereinheit IV zu verzeichnen. Alle anderen Mutanten zeigten ein mehr oder weniger weitgehend lückenhaftes Untereinheitenmuster. Die jeweiligen Defektkombinationen wurden im einzelnen beschrieben und diskutiert.

7) Vorversuche zur Transformierbarkeit von pet-ts Mutanten mit einer Hefegenbank wurden durchgeführt. Die Klonierung bestimmter PET-Gene erfolgte dabei jedoch noch nicht.

Abb. 28, Bild 1-22: In dieser Abbildung sind die 22 Original-Gelbilder der in dieser Arbeit durchgeführten "Western-Blot"-Analysen von Zellextrakten aus pet-ts Mutanten gezeigt. Die Komplementationsgruppe jeder Mutante ist in Klammern angegeben.

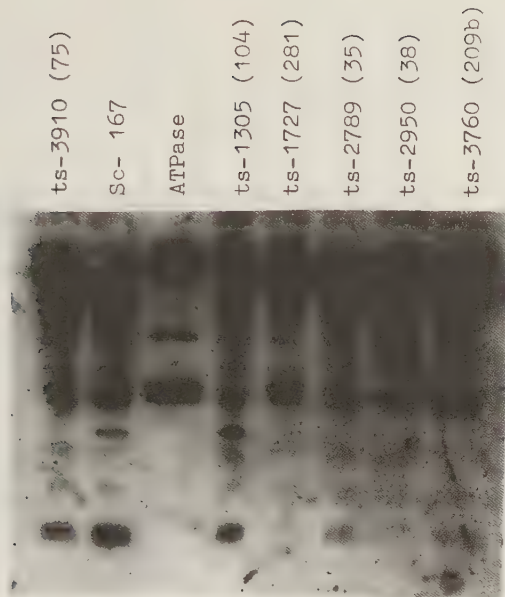


Abb. 28-1

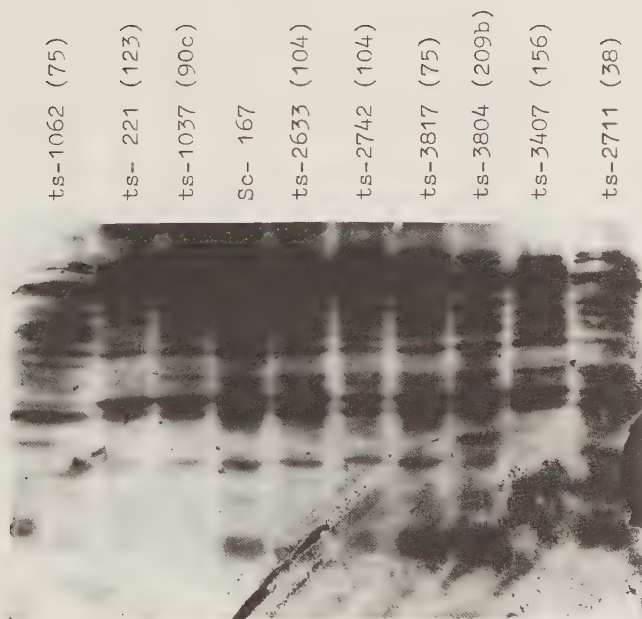


Abb. 28-2

Abb. 28-3

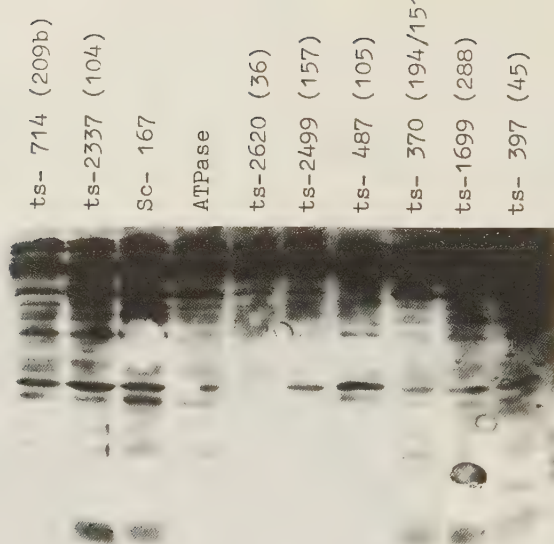
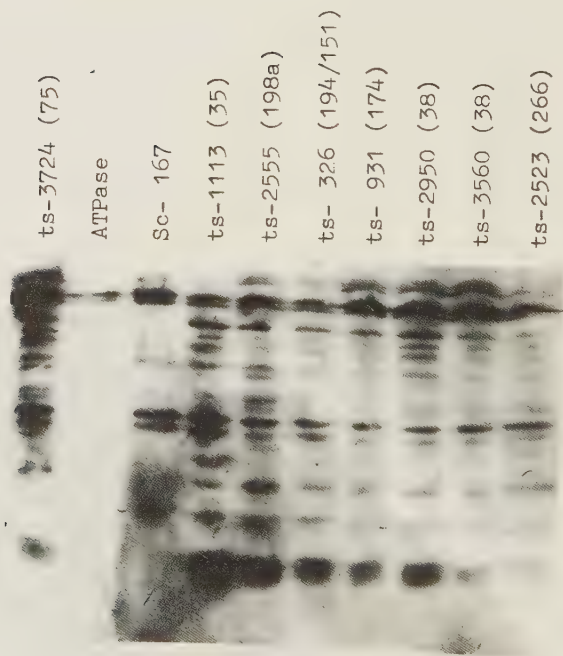


Abb. 28-4



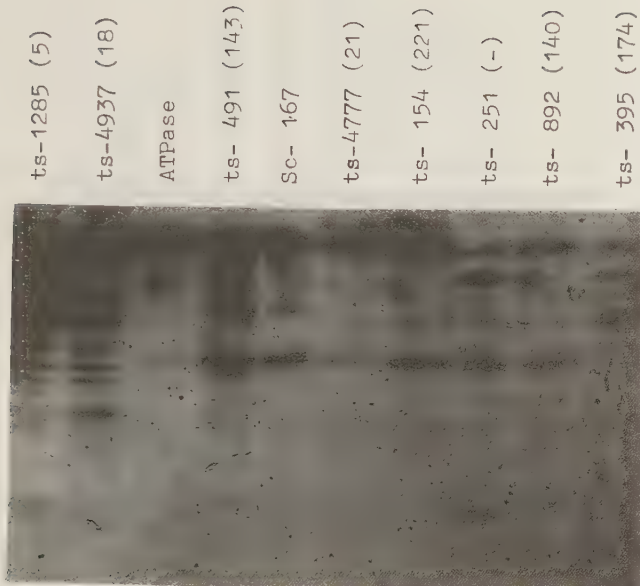


Abb. 28-5

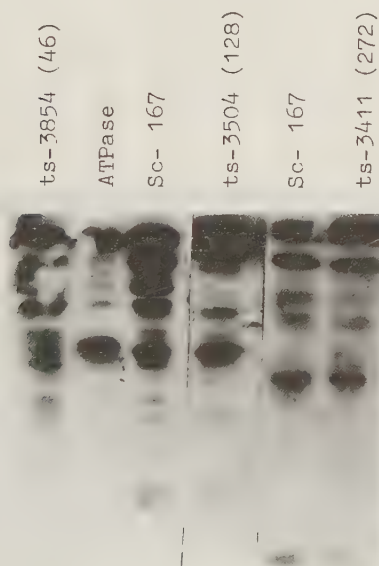


Abb. 28-6

Abb. 28-8

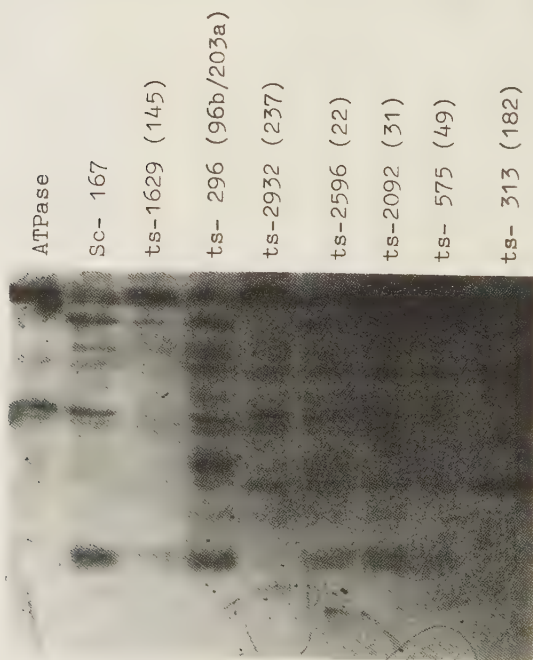


Abb. 28-7

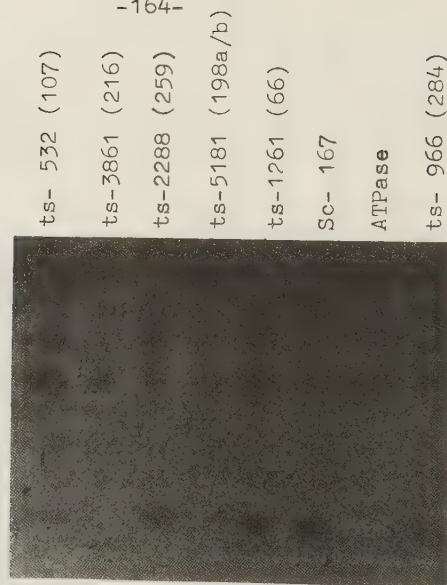


Abb. 28-10

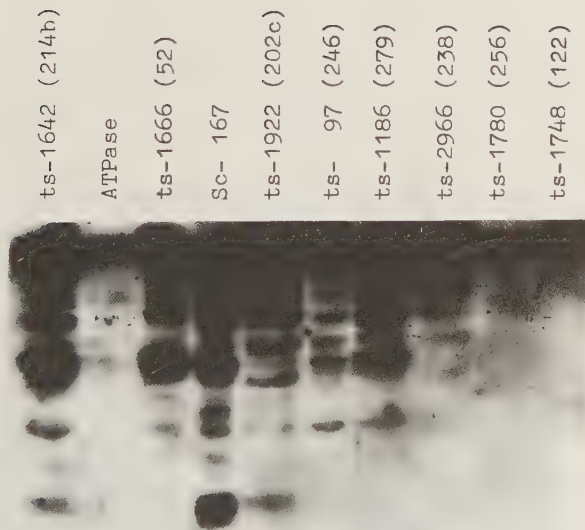
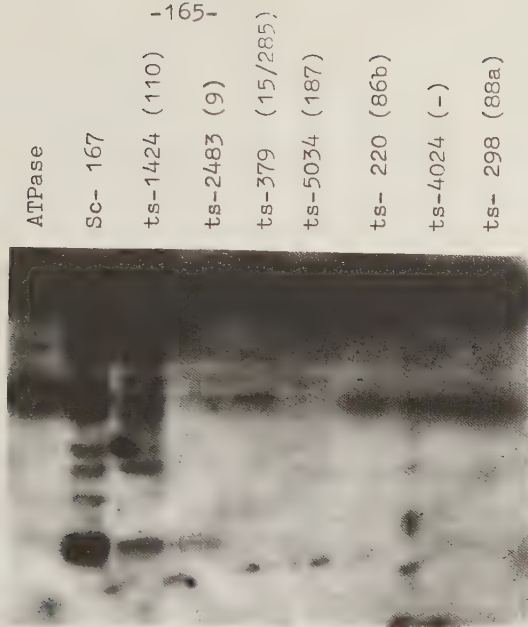


Abb. 28-9



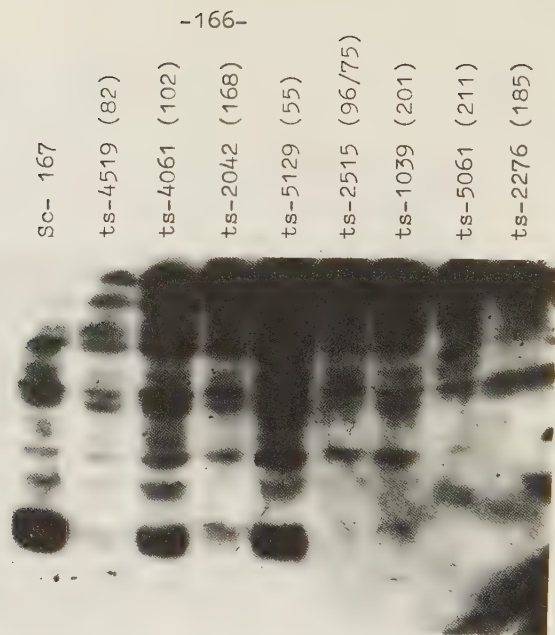


Abb. 28-11

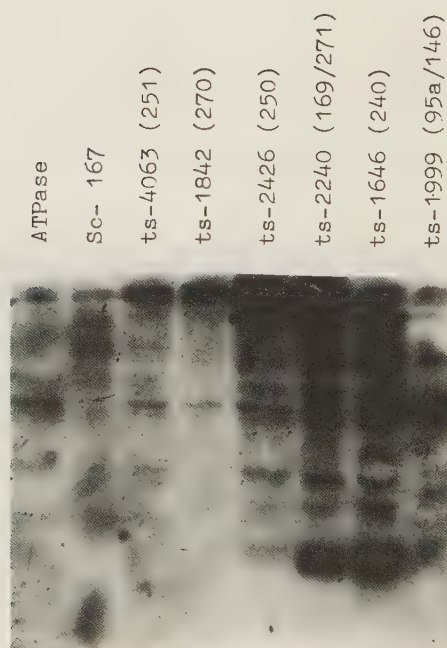


Abb. 28-12

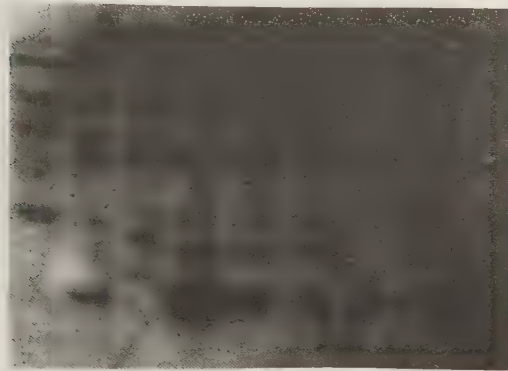


Abb. 28-13

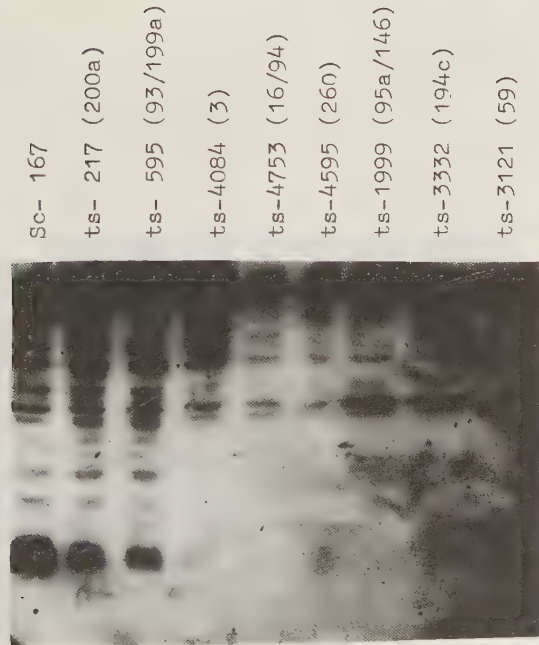
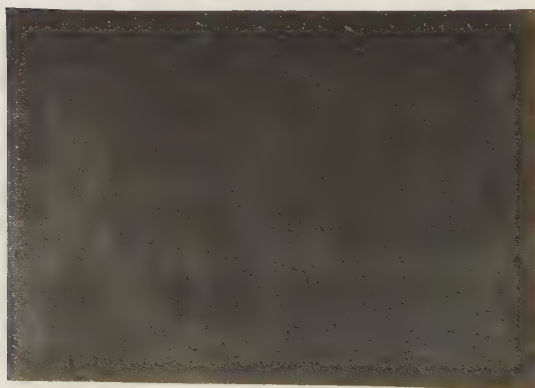


Abb. 28-14

Abb. 28-16



ts-1133 (278/189)
 ts- 785 (93/199a)
 ATPase
 Sc- 167
 ts-1670 (207b)
 ts-1469 (78)
 ts-1558 (-)
 ts-4246 (188)
 ts-1353 (193b)
 ts-2100 (194a/151)

Abb. 28-15



ts-2498 (152)
 ATPase
 Sc- 167
 ts-3403 (104)
 ts- 310 (99)
 ts-3077 (199b/198)
 ts- 120 (76)
 ts-1321 (230)
 ts- 348 (100)
 ts-1589 (-)

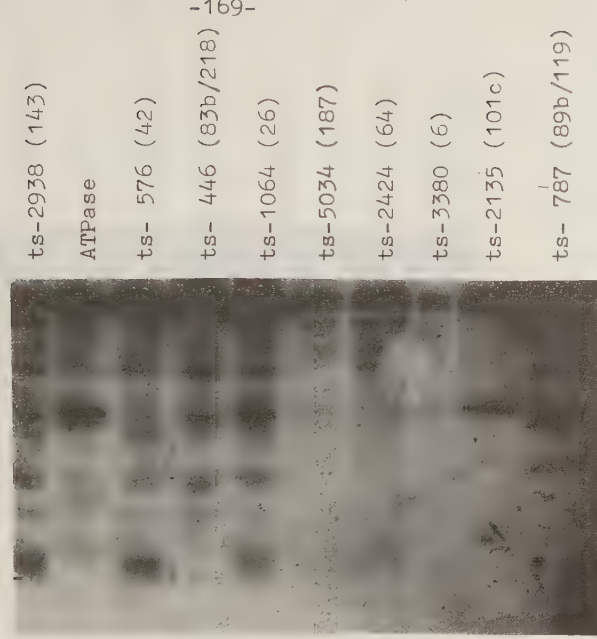


Abb. 28-17

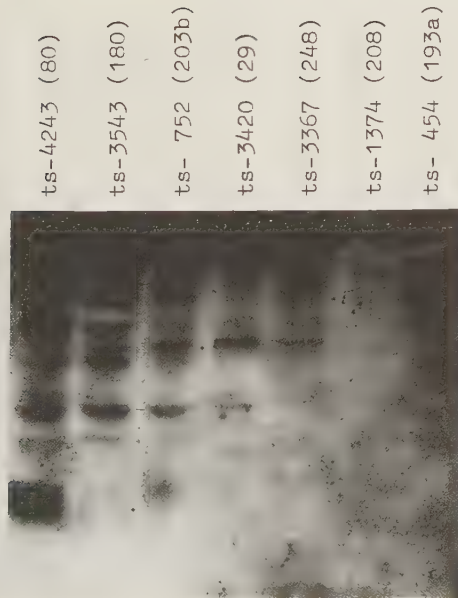
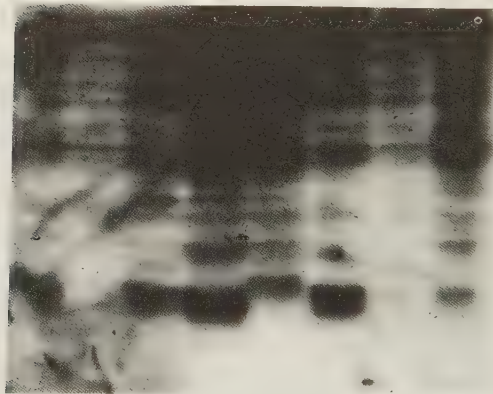
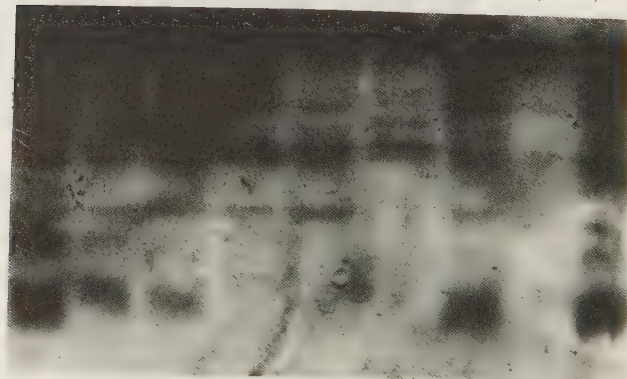


Abb. 28-18



ts-2326 (67)
 ts- 143 (44)
 ts-1188 (232)
 ts- 390 (4)
 ts- 630 (271)
 ts-2081 (88c/20)
 ts-3380 (6)
 ts-2687 (29)

Abb. 28-19



ts- 642 (46)
 ts-4271 (192a)
 ts-3645 (83a)
 ts-2281 (158)
 ts-4750 (90b)
 ts-2262 (18)
 ts-4673 (4)
 ts-2583 (241)
 ts- 892 (140)

Abb. 28-20

ts-3407 (156)
ts-2998 (238)
ts-1138 (39)
ts-1937 (32)
ts-2270 (175)
ts-2276 (185)

Abb. 28-21

ts- 507 (9/131)
ts-1075 (207a)
ts-3854 (46)
ts-3957 (3)
ts-1233 (11)
ts-1062 (75)
ts-1737 (200a)
ts-4030 (102)
ts-1339 (209a)

Abb. 28-22

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) G. Burkl, W. Demmer, U. Holzner und E. Schweizer,
"Genetics, biogenesis and bioenergetics of mitochondria"
S. 39, W. Bandlow et al (eds), Walter de Gruyter, Berlin
New York (1976).
- (2) Konstruiert aus HB 101 von R.L. Rodrigues, vgl.
R.L. Roudrigues, F. Boliver, H.M- Goodman, H.W. Boyer
und M.C. Betlach in "Molecular mechnism in the control
of gene expression" (eds. D.P. Nierlich, W.J. Rutter und
C.F. Fox), S. 471, Academic Press, New York (1976).
- (3) M.R. Chevallier, J.C. Bloch und F. Lacroust, Gene 11,
11 (1980).
- (4) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Rand,
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- (5) M. Bradford, Anal. Biaochem. 72, 248 (1976).
- (6) J.R. Whitaker und P.E. Granum, Anal. Biochem. 109, 156
(1980).
- (7) R.F. Jtaki und D.M. Gill, Anal. Biaochem. 9, 401 (1964).
- (8) J. Höltke, Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg.
- (9) J. Naggert, Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg.
- (10) T. Yonetami, J. Bio.Cem. 240, 4509 (1965).
- (11) P. Karlson, "kurzes Lehrbuch der Biochemie" 11. Auflage,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1980).

- (12) Biochemica information I, II, Boehringer Mannheim GmbH (1973).
- (13) B. Lang, G. Burger, I. Doxiadis, D.Y. Thomas, W. Bandlows und F. Kaudewitz, Anal. Biochem. 77, 110 (1977).
- (14) L.M. Hjemelund, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6368 (1980).
- (15) I.R. Ryrie, Arch. Biochem. Biophys. 184, 464 (1977).
- (16) U.K. Laemmli, Nature 227, 680 (1970).
- (17) Ö. Ouchterlony, Prog. Allergy 6, 30 (1962).
- (18) W. Langut, Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg (1984).
- (19) A. Greenwood und F. Hunter, Biochem. J. 89, 114 (1963).
- (20) M.R. Chevallier, J.C. Bloch und F. Lacroust, Gene 11, 11 (1980).
- (21) M.E.S. Hudspeth, D.S. Shumard, K.M. Tatti und L.I. Grossman, Biochem. Biophys. Acta 610, 221 (1980).
- (22) J.B. van Ommen, G.S.P. Groot und L.A. Grivell, Cell 18, 511 (1979).
- (23) S.R. Kushner und D. Vapnek in "Media and methods for bacterial genetics", S. 40, Dep. Biochemistry and Microbiology of Georgia, Athens (1980).
- (24) H.C. Birnboim und Y. Doly, Nucl. Acids Res. 7, 1513 (1979).
- (25) J.D. Beggs, Nature 275, 104 (1978).

- (26) J.N. Bicknell und M.G. Douglas, J. Bacteriol. 101, 505 (1970).
- (27) T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook "Molecular Cloning" S. 104, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- (28) J. Naggert, Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg (1983).
- (29) E.S. Polakis, W. Bartley und G.A. Meek, Biochemistry J. 97, 298 (1965).
- (30) R. Harrer, Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg (1985).
- (31) D. Todd, T.A. Griesenbeck und M.G. Douglas, J. Biol.Chem. 255, 5461, (1980).
- (32) A. Tzagoloff, G. Macino und W. Sebald, Ann. Rev. Biochem. 48, 419 (1979).
- (33) P.A. Whitaker und S.M. Danks, "Mitochondria: Structure, Function and Assembly", 1. Auflage, Longman Group Ltd. London (1978).
- (34) M.L. Machenochini, Y. Rudin, G. Blobel und G. Schatz, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 343 (1973).
- (35) M. Douglas und R.A. Butow, Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1083 (1976).
- (36) L.A. Grivell, Spektrum der Wissenschaft 5, 72 (1983).
- (37) P. Mitchell, Angew. Chem. 91, 718 (1979).
- (38) F.G. Nobrega und A. Tzagoloff, J. Biol.Chem. 255, 9828 (1980).

- (39) S. Bonitz, G. Cuttuzzi, B.E. Thalenfeld und Tzagoloff, J. Biol. Chem. 255, 11927 (1980).
- (40) J.L. Bos, C. Heyting, P. Borst, A.C. Amberg, E.F.J. van Bruggen, Nature 275, 336 (1978).
- (41) P. Borst und L.A. Grivell, Nature 289, 439 (1981).
- (42) J. Lazowska, C. Jacq und P.P. Slonimsky, Cell 22, 333 (1980).
- (43) H.W. Tahedl, U. Holzner, W. Demmer und E. Schweizer, "Mitochondria 1977: Genetics and biogenetics of mitochondria" S. 91, ed. W. Bandlow et al (1977).
- (44) A.S. Lewin, I. Gregor, T. Mason, N. Nelson und G. Schatz, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3998 (1980).
- (45) G. Schatz, FEBS Letters 103, 203 (1979).
- (46) W. Neupert und G. Schatz, TIBS 59, 1 (1981).
- (47) A. Gallagher und I.R. Ryrie, Biochem. Biophys. Acta 545 1 (1979).
- (48) R.D. Todd and M.G. Douglas, J. Biol. Chem. 256, 6984 (1981).
- (49) I.G. Macreadie, C.E. Novitski, R.J. Maxell, U. John, B.G. Ooi, G.L. Muller, H.B. Luthins, A.W. Linnane und P. Nagley, Nucl. Acid Res. 11, 4435 (1983).
- (50) J. Veloure, J. Hoppe, W. Sebald, P. Daumas, F. Heitz und B. Guerin, "Thrid eiropean bioenergetics conference" Congress-Edition, S. 79, Hannover (1984).
- (51) G. Schatz, J. Biol. Chem. 248, 5360 (1973).

- (52) A.Tzagoloff, J. Biol. Chem. 250, 8228 (1975).
- (53) A.S. Lewin und D.K. Norman, J. Biol. Chem. 258, 6750 (1983).
- (54) P.C.Mc.Ada. und M.G. Douglas, J. Biol. Chem. 257, 3177 (1982).
- (55) R. Schittenhelm, persönliche Mitteilungen.
- (56) L. Boutry und A. Goffeau, J. Biol. Chem. 125, 471 (1982).
- (57) E. Winnacker, "Gene und Klone" S. 164, Klett Verlag (1984).
- (58) G. Schatz und E. Ebner, J. Biol. Chem. 248, 5379 (1973).
- (59) J. Saltzberger-Muller, S.P. Kunapuli und M.G. Douglas, J. Biol. Chem. 258, 11465 (1983).

Lebenslauf

1. Angaben zur Person:

Name: Jäger, Klaus Andreas
Geburtsdatum/Ort: 2. Juni 1954 in Ansbach
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Verheiratet
Anschrift: Würzburger Ring 39, 8520 Erlangen

2. Schulbildung:

1960-1965 Volksschule Ansbach
1965-1970 Platen-Gymnasium Ansbach
1970-1974 Hardenberg-Gymnasium Fürth

Abschluß: Abitur

3. Wehrdienst:

07/74-09/75 Wehrpflichtiger

4. Studium:

11/75-10/80 Studium der Werkstoffwissenschaften an der Universität Erlangen-Nürnberg.
Abschluß: Diplom.

5. Promotion:

ab 03/81 Doktorand bei Prof. Dr. E. Schweizer im Fachbereich Biochemie in Erlangen.

COPY-SHOP

Pfarrstraße 9
8520 Erlangen Tel. 28525